

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Nikola Šejgunovová

Molekulární a ultrastrukturní aspekty stavby holokinetických chromozomů
Molecular composition and ultrastructure of holokinetic chromosomes

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jiří Král, CSc.

Praha, 2018

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Královi, CSc. za cenné rady, pomoc a čas, které mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat A.C. Reyes Lerma za poskytnutí použitého snímku a své rodině za podporu, kterou mi při psaní této práce poskytli.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.5.2018

Podpis

Abstrakt

Holokinetické chromozomy jsou zvláštním typem chromozomů, které se od chromozomů standardních (monocentrických) odlišují zejména difúzní podobou vazebné domény pro mikrotubuly (holocentromery). S tím jsou spojeny další změny na ultrastrukturní a molekulární úrovni. Tyto změny se projevují v modifikacích mitotického a meiotického dělení a v evoluci karyotypů. Holokinetické chromozomy nemají primární konstriktci, do které by lokalizovala centromera, a tedy ani vnitřní centromerickou doménu, která by spojovala sesterské chromatidy. Stavba kinetochoru holokinetických chromozomů se zdá být jednodušší než u chromozomů monocentrických. Kinetochor pokrývá většinu povrchu mitotických chromozomů. U organismů s holokinetickými chromozomy bylo popsáno několik variant meiózy, které se liší umístěním kinetochoru na chromozomu. Na molekulární úrovni se holokinetické chromozomy od chromozomů monocentrických liší rozložením proteinů centromericko-kinetochorového komplexu, které pokrývají značnou část povrchu mitotických a meiotických chromozomů. Jedná se například o centromerický histon H3 (CENH3), jehož množství a rozložení se navíc během interfáze a jaderného dělení liší, což je v porovnání s monocentrickými chromozomy unikátní. Odlišné je i rozložená epigenetických modifikací a repetitivních sekvencí.

Klíčová slova: centromera, DNA, evoluce, histon, holokinetický, chromatin, chromozom, jaderné dělení, kinetochor, meióza, modifikace, stavba

Abstract

Holokinetic chromosomes are a specific type of chromosomes which differentiate from standard (monocentric) chromosomes especially by a diffuse form of domain which binds microtubules (holocentromere). It is related to changes on an ultrastructural and molecular level. These changes are shown in modifications in mitotic and meiotic division and in evolution of karyotypes. Holokinetic chromosomes don't have a primary constriction with a localized centromere and therefore neither an inner centromere domain which would connect sister chromatids. Kinetochore structure of holokinetic chromosomes seems to be simpler than kinetochore structure of monocentric chromosomes. Kinetochore covers most of the surface of mitotic chromosomes. There have been described several variants of meiosis of holokinetic chromosomes which differentiate by position of kinetochore on chromosomes. On a molecular level holokinetic chromosomes differentiate from monocentric chromosomes by a distribution of proteins of a centromere-kinetochore complex, which cover most of the surfaces of mitotic and meiotic chromosomes. This applies, for example, to centromeric histone H3 (CENH3), whose amount and distribution changes during interphase and nuclear division, which is unique in comparison to monocentric chromosomes. The distribution of epigenetic marks and repetitive sequences is also different.

Key words: centromere, chromatin, chromosome, DNA, evolution, histone, holokinetic, kinetochore, nuclear division, meiosis, modification, structure

Obsah

Seznam použitých zkratk

1	Úvod	- 1 -
2	Struktura genomu u organismů s holokinetickými chromozomy	- 2 -
2.1	Počet chromozomů a velikost genomu	- 2 -
2.2	Rozmístění genů na chromozomech	- 3 -
2.3	Repetitivní sekvence.....	- 4 -
2.4	Obsah AT a CG párů.....	- 4 -
3	Organizace chromatinu	- 6 -
3.1	AT a CG bohatý heterochromatin	- 7 -
3.2	Epigenetické modifikace chromatinu	- 7 -
4	Modifikace centromery organismů s holokinetickými chromozomy	- 9 -
4.1	Ultrastrukturní stavba	- 9 -
4.2	Molekulární stavba.....	- 11 -
4.2.1	Repetitivní sekvence	- 12 -
4.2.2	Centromerická varianta histonu H3, CENH3.....	- 13 -
4.2.3	Změny hodnoty centromerické varianty histonu H3 v průběhu buněčného cyklu	- 14 -
4.2.4	Fosforylace threoninu 120 histonu H2A, H2AThr120ph	- 15 -
4.2.5	Sestavení kinetochoru	- 17 -
4.3	Centromerický a holokinetický tah	- 20 -
5	Ribozomové DNA	- 22 -
6	Procesy chromozomové koheze, kondenzace a segregace u organismů s holokinetickými chromozomy.....	- 23 -
6.1	Koheze	- 23 -
6.1.1	Pre-redukční dělení	- 24 -
6.1.2	Post-redukční dělení	- 26 -
6.2	Kondenziny	- 27 -
6.2.1	Zvýšená rigidita holokinetických chromozomů jako prevence merotelického připojení dělicího vřeténka.....	- 29 -
6.3	Fosforylace histonu H3	- 30 -
7	Závěr	- 30 -
8	Seznam použité literatury.....	- 31 -

Seznam použitých zkratek

A	Adenine	Adenin
AIR-2	Aurora/IPL1-related protein kinase 2	Protein kináza 2 příbuzná Aurora kináze a IPL1 proteinu
Bub1	budding uninhibited by benzimidazoles 1 protein	Protein kináza mitotického kontrolního bodu
C	Cytosine	Cytosin
C	The amount of DNA in a haploid nucleus	Množství DNA obsažené v haploidním jádru
CCAN	Constitutive centromere associated network	Proteiny vnitřního kinetochoru
CeBub1	<i>Caenorhabditis elegans</i> budding uninhibited by benzimidazoles 1	Bub1 kináza háďátka obecného (<i>Caenorhabditis elegans</i>)
CeCENP-A	<i>Caenorhabditis elegans</i> centromeric histone H3	Centromerický histon H3 háďátka obecného (<i>Caenorhabditis elegans</i>)
CeCENP-C	<i>Caenorhabditis elegans</i> Centromeric protein C	Centromerický protein C háďátka obecného (<i>Caenorhabditis elegans</i>)
CeMCAK	<i>Caenorhabditis elegans</i> mitotic centromere-associated kinesin	Kinezin asociující v mitóze s centromerou háďátka obecného (<i>Caenorhabditis elegans</i>)
CENH3	Centromeric histone H3	Centromerický histon H3
CENP-A	Centromeric protein A	Centromerický protein A
CENP-C	Centromeric protein C	Centromerický protein C
CMA ³	Chromomycin A3	Chromomycin A3
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-diamidino-2-fenylindol
DC	Dosage compensation	Dávková kompenzace
DRH-3	Dicer-related helicase	Helikáza podílející se na vzniku 22-G RNA
EGO-1	Enhancer of Glp-One	RNA-dependentní RNA polymeráza
EKL-1	Enhancer of <i>ksr-1</i> lethality	Protein podílející se na vzniku 22-G RNA
G	Guanine	Guanin
H2A	Histone 2A	Histon 2A
H2AThr120ph	Phosphorylation of threonine 120 of histone H2A	Fosforylace threoninu 120 histonu H2A
H3	Histone H3	Histon H3
H3 pT3	Phosphorylation of threonine 3 of histone H3	Fosforylace threoninu 3 histonu H3
H3K27	Lysine 27 of histone H3	Lysin 27 histonu H3
H3K36	Lysine 36 of histone H3	Lysin 36 histonu H3
H3K4	Lysine 4 of histone H3	Lysin 4 histonu H3
H3K4me2	Dimethylation of lysine 4 of histone H3	Dimethylace lysinu 4 histonu H3
H3K9	Lysine 9 of histone H3	Lysin 9 histonu H3
H3K9me2	Dimethylation of lysine 9 of histone H3	Dimethylace lysinu 9 histonu H3
H3T3	Threonine 3 of histone H3	Threonin 3 histonu H3
H4K20	Lysine 20 of histone H4	Lysin 20 histonu H4
HCP-6	Holocentric protein 6	Holocentrický protein 6

HIM-10	High incidence of males protein 10	Kinetochorový protein NDC80 komplexu
HORMA	Hop1p, Rev7p, MAD2 proteins	Hop1, Rev7, MAD2 proteiny
HOT	High occupancy target	Místa časté vazby transkripčních faktorů
HTP-1	Him three paralog 1	Paralog proteinu HIM-3
HTP-2	Him three paralog 2	Paralog proteinu HIM-3
KLP-19	Kinesin-like protein 19	Protein podílející se na správné orientaci chromozomů při buněčném dělení
LAB-1	Long Arms of the Bivalent protein 1	Protein lokalizující do dlouhých ramen bivalentu
LCS1	<i>Luzula</i> centromeric sequence 1	Centromerická sekvence 1 biky sněhobílé (<i>Luzula nivea</i>)
LnCENH3	<i>Luzula nivea</i> centromeric histone H3	Centromerický histon H3 biky sněhobílé (<i>Luzula nivea</i>)
Mbp	Megabase pair	Megapár bází
MCAK	Mitotic centromere-associated kinesin	Kinezin asociující v mitóze s centromerou
Nuf2	Nuclear filament-containing protein 1	Kinetochorový protein NDC80 komplexu
Pds5	Precocious dissociation of sisters protein 5	Protein účastnící se koheze sesterských chromatid
PP1	Protein phosphatase 1	Protein fosfatáza 1
PP2A	Protein phosphatase 2A	Protein fosfatáza 2A
Rec8	Recombination protein 8	Homolog proteinu Scc1 specifický pro meiotické dělení
S	Svedberg	Svedberg
Scc1	Sister chromatid cohesion protein 1	Protein 1 kohezinového komplexu
Scc3	Sister chromatid cohesion protein 3	Protein 3 kohezinového komplexu
Ser10	Serine 10	Serin 10
Ser28	Serine 28	Serin 28
SKP1	S-phase kinase associated protein 1	Centromerický protein
SMC	Structural maintenance of chromosomes	Proteiny podílející se na kondenzaci a kohezi chromozomů
Smc1	Structural maintenance of chromosomes protein 1	Smc protein 1
Smc3	Structural maintenance of chromosomes protein 3	Smc protein 3
SYP	synaptonemal complex protein	Protein synaptonemálního komplexu
SYP-1	Synaptonemal complex protein 1	Protein 1 synaptonemálního komplexu
SYP-2	Synaptonemal complex protein 2	Protein 2 synaptonemálního komplexu
T	Thymine	Thymin
μm	Micrometre	Mikrometr

1 Úvod

Holokinetické chromozomy pozoroval za použití světelné mikroskopie Theodor Boveri již na konci 19. století, který si všiml, že se vlákna dělicího vřeténka při jaderném dělení upínají na značnou část povrchu chromozomů. Světelná mikroskopie je dodnes často využívanou metodou pro detekci holokinetických chromozomů. Holokinetická struktura chromozomů byla experimentálně dokázána na počátku 40. let 20. století za použití rentgenového záření, které indukuje chromozomové zlomy. Takto vzniklé fragmenty se díky difúzní podobě vazebné domény pro mikrotubuly, která je typická pro holokinetické chromozomy, mohou přenášet do dalších buněčných generací. Přítomnost fragmentů v dalších buněčných generacích, bez tvorby mikrojádra, je považována za jeden z důkazů holokinetické stavby chromozomů. Hojně využívanou metodou detekce holokinetických chromozomů je zobrazení lokalizace proteinů centromericko-kinetochorového komplexu za použití protilátek. Signál je u holokinetických chromozomů pozorován na většině povrchu mitotických chromozomů.

Pojem holokinetické chromozomy odkazuje k rozšíření kinetické aktivity na většinu povrchu mitotických chromozomů. Jelikož holokinetické chromozomy nemusí mít difúzní podobu vazebné domény pro mikrotubuly i v meiotickém dělení, tak se někteří autoři přiklánějí k staršímu označení holocentrické chromozomy.

S holokinetickou stavbou chromozomů jsou spojeny specifické změny na ultrastrukturní a molekulární úrovni, jejichž ucelené shrnutí je cílem mé práce. Ultrastrukturní změny spočívají například v absenci primární konstriktce s lokalizovanou centromerou. Vnitřní centromerická doména, která u monocentrických chromozomů zajišťuje spojení sesterských chromatid, není vyvinuta a sesterské chromatidy jsou spojeny po celé své délce. Vazebná doména pro mikrotubuly pokrývá většinu povrchu chromozomu. V důsledku navázání vláken dělicího vřeténka na většinu povrchu dochází v mitotické anafázi k paralelnímu rozchodu sesterských chromatid. Mezi změny na molekulární úrovni patří především rozložení proteinů centromericko-kinetochorového komplexu po většině délky chromozomů, odlišné rozložení některých epigenetických modifikací a repetitivních sekvencí.

Se strukturními změnami stavby holokinetických chromozomů jsou spojeny specifické modifikace meiotického dělení. Podle polohy kinetochoru rozeznáváme několik typů meiózy. Homologní chromozomy se mohou rozcházet v prvním meiotickém dělení, podobně jako u monocentrických chromozomů. Tento typ meiózy je nazýván jako pre-redukční dělení.

V případě, že se v prvním meiotickém dělení rozcházejí sesterské chromatidy, tak se jedná o invertovanou neboli holokinetickou meiózu, která je typem post-redukčního dělení.

Holokinetické chromozomy se vyvíjely konvergentní evolucí z monocentrických chromozomů a vyskytují se v několika nepříbuzných liniích mezi živočichy, rostlinami i protisty. Z živočišné říše se jedná hlavně o většinu hlístic a některé skupiny hmyzu. Holokinetické chromozomy mají například všichni zástupci motýlů, vážek, mšic, škvorů, chrostíků, vší a všenek a někteří zástupci pavoukovců. U rostlin nacházíme holokinetické chromozomy například u šáchorovitých a sítinovitých rostlin či u rosnatek a kokotic. Ve skupině protist mají holokinetické chromozomy například nádorovky. Přesný počet druhů s holokinetickými chromozomy zatím nebyl stanoven, přibližně se však jedná o půl milionu druhů a tento počet s novými studiemi dále narůstá. Studium holokinetických chromozomů by mohlo objasnit mnohé aspekty ultrastrukturní a molekulární stavby a evoluce monocentrických chromozomů.

2 Struktura genomu u organismů s holokinetickými chromozomy

2.1 Počet chromozomů a velikost genomu

Difúzní podoba vazebné domény pro mikrotubuly holokinetických chromozomů zajišťuje, že agmatoploidie, tj. chromozomové rozpady, a symploidie, tj. chromozomové fúze, jsou tolerovány lépe než u monocentrických chromozomů. Rozpady monocentrických chromozomů často vedou ke ztrátě fragmentu, který nenese centromeru. Takto způsobené delece se u holokinetických chromozomů obvykle nevyskytují, jelikož v obou částech po rozpadu chromozomu zůstává část difúzní vazebné domény pro mikrotubuly. V případě chromozomové fúze monocentrických chromozomů může vznikat nestabilní dicentrický chromozom, zatímco u chromozomů holokinetických je produkt fúze, díky difúzní podobě vazebné domény pro vazbu mikrotubulů, stabilní (Hipp et al., 2009; Kuta et al., 2004, Lysák a Schubert, 2013).

V důsledku vyšší tolerance holokinetických chromozomů k chromozomovým fúzím a rozpadům, jsou v jejich evoluci tyto jevy častější. To je patrné na velmi široké a téměř plynulé škále počtu chromozomů mezi nepříbuznými druhy, ale často i na variabilitě počtu chromozomů v rámci jednoho druhu (Bureš et al., 2013; Yano a Hoshino, 2006).

Někteří autoři usuzují, že organismy s holokinetickou stavbou chromozomů mají menší genomy v porovnání s příbuznými druhy s monocentrickými chromozomy, to bylo studováno zejména u rostlin (Bureš et al., 2013; Šmarda et al., 2014). Veleba (2017) za využití analýzy fylogeneze tuto hypotézu u rosnatkovitých rostlin s holokinetickými chromozomy ale nepotvrdil. Menší genomy tedy nemusí být přímým důsledkem holokinetické stavby chromozomů. Zřejmě se jedná o složitější vztah, kdy je mezi počtem chromozomů a velikostí genomu silná korelace (negativní či pozitivní). Tento vztah ovlivňuje velikost genomů a počet chromozomů holokinetických chromozomů a dále se jím zabývám na str. 21 (Bureš a Zedek, 2014; Escudero et al., 2015).

2.2 Rozmístění genů na chromozomech

Monocentrické chromozomy jsou členěné na genově bohaté a genově chudé úseky. U některých organismů s holokinetickými chromozomy, například u některých druhů pavoukocvů, mšic a hlístic, bylo pozorováno uniformní rozložení genů na autozomech (*C. elegans* Sequencing Consortium, 1998; Grbić et al., 2011; Manicardi et al., 1998). To by mohlo být vysvětleno difúzní podobou vazebné domény pro mikrotubuly, typickou pro holokinetické chromozomy, která podporuje fixování některých chromozomových přestaveb, jako například chromozomových rozpadů, vedoucích k rozrušení genově bohatých úseků a následně k uniformnímu rozložení genů na chromozomu (Mandrioli et al., 2017).

Přestože bychom v evoluci holokinetických chromozomů mohli očekávat vyšší frekvenci chromozomových přestav typu fúzí a rozpadů, tak byla paradoxně pozorována vysoká míra syntenie (konzervovanost bloků genů ve vazbě) mezi zkoumanými holokinetickými druhy motýlů (d'Alençon et al., 2010). Syntenie byla dokonce často zachována i mezi holokinetickými mšicemi a dvoukřídlým hmyzem (Mandrioli et al., 2017), jehož zástupci se vyznačují monocentrickými chromozomy. Zdá se tedy, že holokinetická struktura chromozomů podporuje často spíše intrachromozomové lokální přestavby, jako duplikace či delece, než přestavby interchromozomové, jako např. rozpady, a přestavby intrachromozomové týkající se větších úseků chromozomu, jako např. inverze, takže makrosyntenie (syntenie týkající se velkého počtu genů) není výrazně ovlivněna. U holokinetických chromozomů některých druhů motýlů byla opravdu pozorována vysoká frekvence lokálních intrachromozomových přestaveb a nízká frekvence intrachromozomových přestav větších částí chromozomů (d'Alençon et al., 2010; Mandrioli et al., 2017).

2.3 Repetitivní sekvence

Repetitivní sekvence jsou sekvence DNA nekódující polypeptid, které se v genomu vyskytují ve více kopiích. Jedná se o znak typický pro eukaryotický genom, ale rozložení těchto repetitiv v genomu se mezi monocentrickými a holokinetickými chromozomy může lišit (Biscotti et al., 2015; Subirana a Messeguer, 2013).

U monocentrických a holokinetických chromozomů se některé vysoce repetitivní sekvence DNA typicky vyskytují v oblasti centromer a difúzních vazebných domén pro mikrotubuly holokinetických chromozomů (Garrido-Ramos, 2017; Marques et al., 2015).

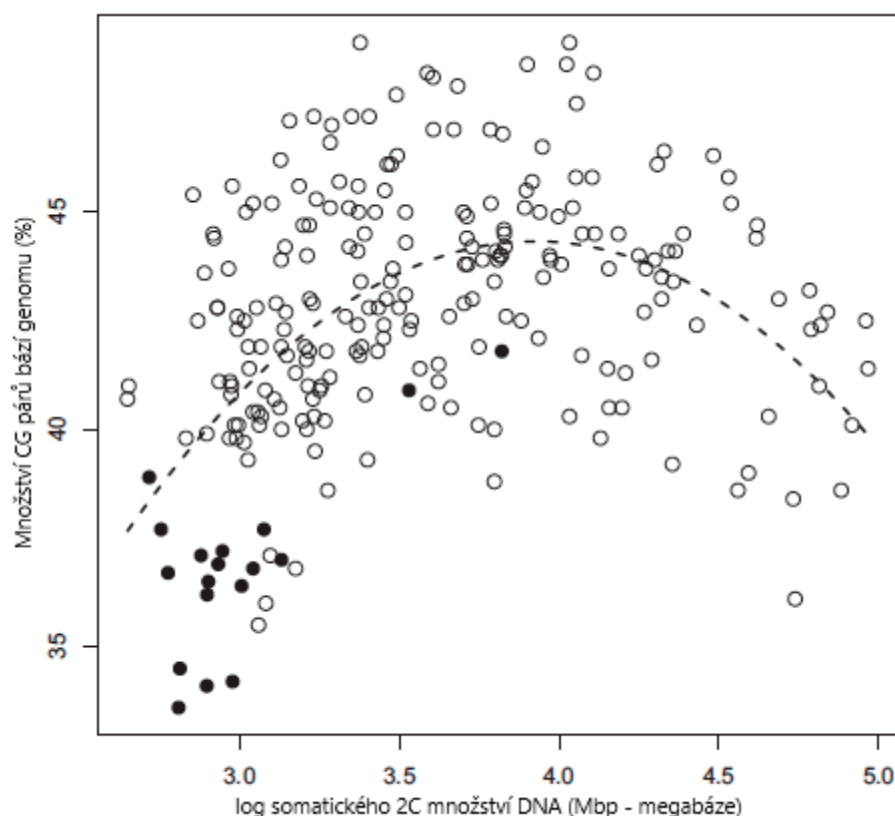
Repetitivní sekvence DNA se vyskytují i mimo úseky, ve kterých dochází k vazbě mikrotubulů, a to jak u monocentrických, tak u holokinetických organismů. V genomech organismů s holokinetickými chromozomy byly nalezeny repetitivní sekvence DNA složené z krátkých motivů, kterých je velké množství a které převažují nad sekvencemi repetitivní DNA s dlouhými motivy. Nemají žádnou jednotnou sekvenci a každý druh má své vlastní motivy. Stejně tak se mezidruhově liší délka jednotlivých monomerů repetitivních DNA sekvencí a celkové množství repetitivních DNA sekvencí v genomu (Subirana a Messeguer, 2013).

Repetitivní sekvence DNA, které nejsou specifické pro oblast vazby mikrotubulů, byly v metafázních holokinetických chromozomech pozorovány v subterminálních a terminálních oblastech. U holokinetických organismů, které podstupují invertovanou meiózu, kdy dochází k uvolnění párování homologních chromozomů i koheze sesterských chromatid již v meióze I, jsou zřejmě vyžadovány k udržení asociace nesesterských chromatid do anafáze II. Repetitivní sekvence nespecifické pro oblast vazby mikrotubulů byly ale pozorovány i v intersticiálních oblastech chromozomu a v klastrech lokalizovaných po celé délce chromozomu (Heckmann et al., 2013; Ribeiro et al., 2017; Subirana a Messeguer, 2013). Jednou z hypotéz je, že by se tyto repetitivní sekvence mohly podílet na zvýšené rigiditě holokinetických chromozomů, a to díky repetitivní povaze sekvence, která by zajistila pravidelnější uspořádání nukleozomů (Subirana a Messeguer, 2013).

2.4 Obsah AT a CG párů

Důležitou kvantitativní hodnotou při studiu genomu je jeho nukleotidové složení, které je většinou vyjádřeno jako procentuální poměr CG párů bází v genomu (Parker, 2001).

Šmarda (2014) při studiu jednoděložných rostlin s monocentrickými i holokinetickými chromozomy našel výraznou korelaci mezi celkovým obsahem CG párů genomové DNA a velikostí genomu, holokinetickou stavbou chromozomů a minimální průměrnou teplotou nejstudenějšího měsíce. Se zvyšující se velikostí genomu docházelo ke zvyšování množství CG párů, avšak druhy s krajními hodnotami velikosti genomů vykazovaly snížení obsahu CG párů. Mezi obsahem CG párů a velikostí genomu byla kvadratická závislost (graf 1).



Graf 1: Znáznornění kvadratické závislosti množství CG párů genomu a 2C množství DNA. Přerušovaná čára je regresní parabola proložená naměřenými daty. Data druhů s holokinetickými chromozomy jsou znázorněna černou plnou tečkou a data druhů s monocentrickými chromozomy jsou znázorněna kroužkem. Převzato a upraveno podle Šmarda et al. (2014).

Šmarda (2014) na základě získaných dat přišel s hypotézou, podle které by byl obsah CG párů v genomu holokinetických druhů snížený. Vysvětluje to zvýšenou rigiditou a menší velikostí holokinetických chromozomů, což by mohlo vést k nižší frekvenci rekombinací. Autoři předpokládají, že to by následně mohlo vést k nižší frekvenci oprav v místech heterologní rekombinace, při kterých se preferenčně uplatňují CG páry.

Veleba (2017) za využití analýzy fylogeneze potvrdil u holokinetických rosnatek pozitivní korelaci obsahu CG párů s velikostí genomu a teplotními výkyvy. Nenašel však rozdíl

v obsahu CG párů mezi holokinetickými a jim blízké příbuznými monocentrickými druhy a nepotvrdil tedy korelaci mezi sníženým množstvím CG párů a holokinetickou stavbou chromozomů. Proto je možné, že snížené množství CG párů přímo nesouvisí s holokinetickou strukturou, ale projevuje se pouze v určitých holokinetických skupinách, popř. je způsobeno kombinací několika různých faktorů.

3 Organizace chromatinu

Eukaryotické chromozomy jsou tvořeny chromatinem, což je složitý komplex DNA, bazických proteinů (což jsou zejména histony) a proteinů nehistonové povahy. Rozlišujeme dvě formy chromatinu, a to euchromatin a heterochromatin. Euchromatin je méně kondenzovaný, transkripčně aktivní chromatin, který v interfázi bývá despiralizován. Heterochromatin je více kondenzovaný, transkripčně inaktivní a v interfázním jádru většinou zůstává spiralizovaný. Heterochromatin dále můžeme rozlišit na konstitutivní a fakultativní. Konstitutivní heterochromatin je tvořen středně či vysoce repetitivní DNA, obsahuje minimum genů a vyskytuje se v některých typických oblastech chromozomu, například v oblasti telomer a u monocentrických chromozomů v oblasti centromer. Můžeme ho vizualizovat pomocí C pruhování. Fakultativní heterochromatin je přítomný v oblastech, kde došlo k cílenému utlumení exprese a jeho výskyt se tedy v průběhu života buňky může měnit (Babu a Verma, 1987; Strålfors a Ekwall, 2011)

První studie zabývající se strukturou chromatinu holokinetických chromozomů došly k závěru, že bloky konstitutivního heterochromatinu jsou rozptýleny po celé délce chromozomu mezi euchromatinovými úseky a díky metafázní kondenzaci dochází k jejich fúzi (Collet a Westerman, 1984).

V následujících studiích na organismech s holokinetickými chromozomy byl konstitutivní heterochromatin nejčastěji pozorován v terminálních oblastech a s menší frekvencí v intersticiálních oblastech. Toto rozložení bylo pozorováno jak u rostlin (Guerra a García, 2004; Vanzela a Guerra, 2000), tak u živočichů (Ituarte a Papeschi, 2004). Uspořádání chromatinu je tedy podobné jako u monocentrických chromozomů. To naznačuje, že difúzní podoba vazebné domény pro mikrotubuly, typická pro holokinetické chromozomy (tj. rozsáhlý kinetochor), nemá na rozložení chromatinu zásadní vliv, přestože bychom mohli očekávat, že by rozložení konstitutivního heterochromatinu ovlivnit mohla. Mohli bychom například očekávat, že se konstitutivní heterochromatin bude vyskytovat častěji v částech

chromozomu, na které se váží mikrotubuly nebo že jeho rozmístění bude rovnoměrné po celém chromozomu (Guerra a García, 2004; Vanzela a Guerra, 2000).

3.1 AT a CG bohatý heterochromatin

Různé organismy s holokinetickými chromozomy se mohou navzájem lišit nejenom lokací, velikostí a množstvím heterochromatinových bloků na chromozomu, ale i zastoupením AT a CG bohatého heterochromatinu (Vanzela a Guerra, 2000). CG a AT bohaté úseky můžeme vizualizovat pomocí fluorescenčního barvení. Typickými fluorochromy zvýrazňujícími AT bohaté úseky jsou DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol), chinakrin a Hoechst 33258. Naopak GC specifické fluorochromy jsou CMA₃ (chromomycin A3), mithramycin a olivomycin (Sumner, 2003).

Stejně jako u standardních chromozomů nalézáme i u organismů s holokinetickými chromozomy bloky s různým zastoupením AT a GC párů bází. Vanzela a Guerra (2000) určili u šáchorovitých rostlin na základě CMA₃/DAPI barvení tři typy heterochromatinu, které se lišily různým zastoupením bází. Mezi zkoumanými druhy nebyl zjištěn žádný společný vzor výskytu heterochromatinu, což ukazuje na jeho vysokou variabilitu, stejně jako u monocentrických chromozomů.

3.2 Epigenetické modifikace chromatinu

Hlavní epigenetické modifikace chromatinu jsou na úrovni DNA a histonů. Epigenetické modifikace ovlivňují celou řadu buněčných procesů, jako například genovou expresi, aniž by došlo ke změně v sekvenci DNA (Fuchs et al., 2006). Některé epigenetické modifikace jsou vysoce konzervované a byly nalezeny u monocentrických i u holokinetických chromozomů (Guerra et al., 2006; Houben et al., 2007; Sotero-Caio et al., 2011).

Histonové modifikace umožňují mimo jiné odlišit heterochromatin a euchromatin. I přes to, že jsou histony a jejich posttranslační modifikace konzervované, jejich rozložení na chromozomu se může lišit u různých organismů a v rámci buněčného cyklu. Modifikace specifické pro euchromatin, tedy metylace lysinu 4 a lysinu 36 histonu H3 (H3K4 a H3K36), jsou mezi eukaryoty konzervované. Modifikace typické pro heterochromatin, což jsou metylace v pozicích lysinu 9 a lysinu 27 histonu H3 (H3K9 a H3K27) a metylace lysinu 20 histonu H4 (H4K20), jsou mezi eukaryoty více variabilní. A to jak z hlediska kvantity jednotlivých modifikací, tak i kombinací modifikací a specifity jednotlivých modifikací k různým typům heterochromatinu (Fuchs et al., 2006).

Houben (2003) našel dimetylovaný lysin 4 histonu H3 (H3K4me2) u všech dvaceti čtyř zkoumaných druhů rostlin s monocentrickými chromozomy v oblasti euchromatinu. Distribuce dimetylovaného lysinu 9 histonu H3 (H3K9me2) u zkoumaných rostlin typická pro heterochromatin, se lišila v závislosti na velikosti genomu. U druhů s většími genomy pozoroval H3K9me2 rovnoměrně po celém chromozomu, a to i v euchromatinových úsecích.

Heckmann (2013) u síťovité rostliny (síťovité rostliny mají holokinetické chromozomy) pozoroval rovnoměrné rozložení histonových modifikací H3K4me2 a H3K9me2 po celém chromozomu, kdy bloky heterochromatinu nebyly od bloků euchromatinu jasně odlišeny. Při použití mikroskopu se strukturovaným osvětlením s vysokým rozlišením, pozoroval jednotlivé proužky značené oblasti H3K4me2 a H3K9me2, které se prolínaly.

Tyto výsledky naznačují, že by se holokinetické chromozomy mohly od monocentrických chromozomů lišit v organizaci chromatinu. Podle mého názoru by rovnoměrné rozložení heterochromatinových oblastí, které jsou více kondenzované než oblasti euchromatinové, po celém chromozomu, mohlo pomoci objasnit možnou zvýšenou rigiditu holokinetických chromozomů, na kterou ukazují některé studie (Stear a Roth, 2002) a která byla doposud spojována zpravidla s převážnou aktivitou kondenzinu II (Maddox et al., 2004; Ono et al., 2003).

Houben et al. (2003) dává difúzní rozložení H3K9me2 do souvislosti s vyšším počtem satelitních repetitiv u větších genomů, které jsou umlčovány, a proto se modifikace jako H3K9me2 vyskytují i v oblastech euchromatinu. Nemuselo by se tedy nutně jednat o specifikum spojené s výskytem holokinetické struktury. Budou potřebné další studie pro objasnění rozložení epigenetických modifikací euchromatinu a heterochromatinu u holokinetických chromozomů.

Epigenetickou modifikací, která se vyskytuje jak u monocentrických, tak u holokinetických chromozomů rostlin, je fosforylace threoninu 120 histonu H2A. Tato modifikace se vyskytuje v oblasti centromer a difúzní domény pro mikrotubuly, a proto je využívána jako jejich marker (dále na str. 15) (Wanner et al., 2015). Další modifikací je fosforylace histonu H3 v pozicích serin 10 a serin 28, která se účastní procesů koheze a kondenzace. Její rozložení se liší mezi monocentrickými a holokinetickými rostlinami (dále na str. 30) (Guerra et al., 2006; Sotero-Caio et al., 2011).

4 Modifikace centromery organismů s holokinetickými chromozomy

Centromera je část chromozomu, která se u monocentrických chromozomů nachází v primární konstrikci, tvořená konstitutivním heterochromatinem bohatým většinou na vysoce repetitivní DNA sekvence. V centromere jsou sesterské chromatidy spojeny, což je zajištěno vnitřní centromerickou doménou. Na vnější centromerické doméně dochází k tvorbě proteinového komplexu, kinetochoru, na nějž se váží vlákna dělicího vřeténka při jaderném dělení (Vagnarelli et al., 2008). Rozeznáváme vnitřní a vnější kinetochor. Vnitřní kinetochor je část kinetochoru, která je v úzkém kontaktu s centromerou. U monocentrických chromozomů je vnitřní kinetochor tvořen proteiny, které jsou zde přítomny po celou dobu buněčného cyklu. Tyto proteiny, zejména centromerická varianta histonu H3 (CENH3), jsou klíčové pro udržení centromerické identity, tzn. pro udržení pozice a funkce centromery. Pozice centromery je tedy u většiny organismů určována spíše epigeneticky než sekvencí DNA. Vnější kinetochor je tvořen proteiny, které jsou více dynamické, nejsou přítomny během celého buněčného cyklu a jejich hlavní funkcí je zprostředkovat kontakt mezi plus konci mikrotubulů a chromozomem (Musacchio a Desai, 2017).

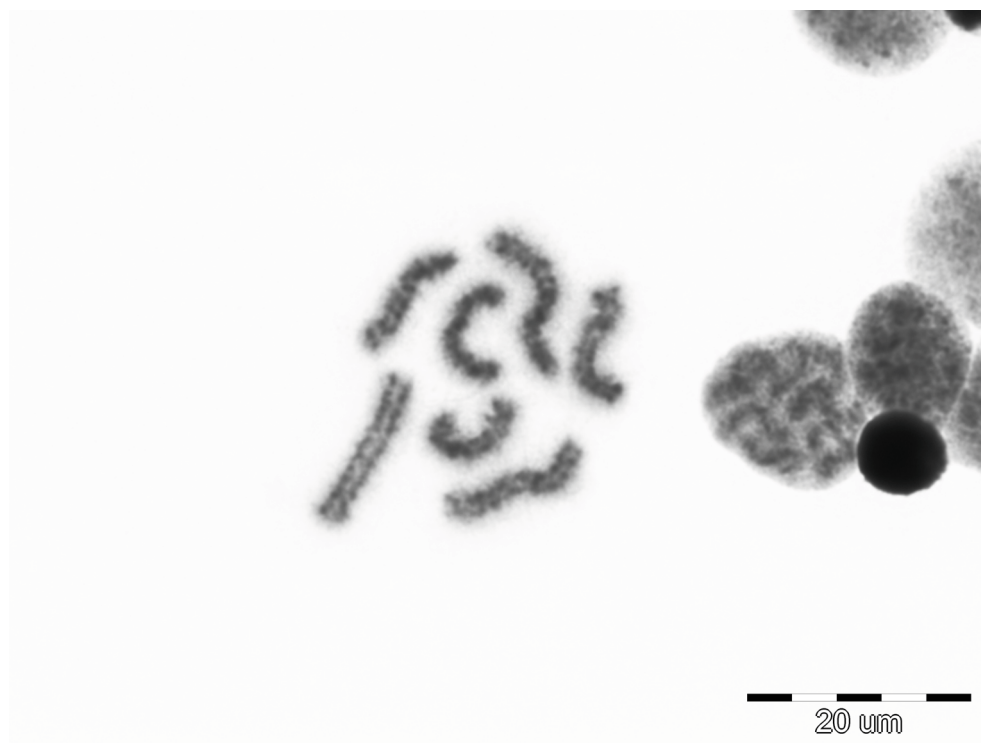
Již v počátcích studia holokinetických chromozomů byly navrženy dva modely holokinetické stavby chromozomů. První model předpokládal souvislé pokrytí chromozomu kinetochorovými proteiny a druhý, polycentrický model, předpokládal více různých míst na chromozomu, do kterých inzerují mikrotubuly (Schrader, 1947). Ukázalo se, že existují oba typy. Při studiu holokinetických organismů musíme brát navíc v potaz jejich konvergentní evoluci a předpokládat možnost jistých specifických odlišností v rámci jednotlivých přechodů k holokinetické stavbě.

Někteří autoři oblasti holokinetických chromozomů, do kterých se váží mikrotubuly nazývají centromerou, jiní se přiklání k pojmu holocentromera, který jasněji odkazuje na difúzní podobu kinetochoru a její modifikovanou stavbu, typickou pro holokinetické chromozomy (Nagaki et al., 2005; Steiner a Henikoff, 2014).

4.1 Ultrastrukturní stavba

U holokinetických chromozomů se nevyskytuje primární konstrikce, do které by lokalizovala centromera a ani vnitřní centromerická doména, která by spojovala sesterské chromatidy (obr. 1). Holokinetické chromozomy jsou tudíž na ultrastrukturní úrovni studovány převážně z hlediska kinetochoru. Kinetochor holokinetických chromozomů je rozsáhlý, pokrývá velkou

část chromozomu, a to v oblastech, které nemusí být nutně tvořeny heterochromatinem nebo být podloženy satelitními repeticemi. U některých organismů s holokinetickými chromozomy není kinetochor vyvinut a mikrotubuly inzerují přímo do povrchu chromozomu (Albertson a Thomson, 1993; Braselton, 1981; Comings a Okada, 1972).



Obr.1: Holokinetické chromozomy pavouka *Dasumia crassitibialis* (Dysderidae) v mitotické metafázi samce ($2n = 7$). Sesterské chromatidy jsou spojeny po celé své délce a není zřetelná primární konstriktce. Převzato od A.C. Reyes Lerma.

Srovnajme tedy kinetochor holokinetických a monocentrických chromozomů. U organismů s monocentrickými chromozomy je známo několik typů kinetochorů, přičemž nejlépe prostudovaným a nejčastějším je trilaminární kinetochor se třemi vrstvami, které se liší svou elektronovou denzitou. Spodní vrstva je elektrondenzní, nad ní je vrstva elektrontransparentní. Vnější vrstva je opět elektrondenzní. V nepřítomnosti mikrotubulů je nad ní pozorována ještě vláknitá struktura, korona (Musacchio a Desai, 2017). Dalším typem kinetochoru je dvouvrstevný „ball in a cup“ kinetochor, vyskytující se převážně u vyšších rostlin (Dawe et al., 2005).

Za použití elektronové mikroskopie byl u řady organismů s holokinetickými chromozomy v mitóze pozorován kinetochor s elektrondenzní vnitřní a vnější vrstvou, mezi nimiž byla vrstva elektrontransparentní, tedy struktura podobná klasickému trilaminárnímu kinetochoru monocentrických chromozomů (Albertson a Thomson, 1982). U některých organismů

s holokinetickými chromozomy byly v mitóze pozorovány dvouvrstevné kinetochory (Wolf et al., 1992). Zatímco u organismů s monocentrickými chromozomy je stavba mitotických a meiotických kinetochorů v zásadě stejná, u holokinetických meiotických chromozomů byly dokumentovány buď kinetochory zjednodušené, nebo dokonce žádné, kdy se vlákna dělicího vřeténka upínají přímo na chromatin, nejčastěji na telomery (Albertson a Thomson, 1993; Braselton, 1981; Comings a Okada, 1972). Umístění kinetochoru holokinetických chromozomů se oproti mitóze může lišit v závislosti na posloupnosti redukčního a ekvačního meiotického dělení u daného organismu (Cabral et al., 2014; Ferrandizetal., 2018; Howe et al., 2001; Papeschi et al., 2003).

Případy, kdy kinetochor u holokinetických chromozomů nebyl pozorován, by mohly být vysvětleny velmi tenkou a tím pádem obtížně detekovatelnou strukturou kinetochoru, kterou Wanner (2015) predikuje pro monocentrické i holokinetické chromozomy některých rostlin. Tato struktura kinetochoru, odlišná od klasického trilaminárního a „ball in a cup“ modelu, by při použití nevhodné zobrazovací techniky mohla působit dojmem absence kinetochoru.

Při fixaci mražením za vysokého tlaku, která zachovává struktury lépe než chemická fixace, byla elektronovým mikroskopem u holokinetického organismu háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*; dále jen háďátko) pozorována v oblasti kinetochoru tenká linie mezi chromozomem a cytoplazmou, bez ribozomů a dalších složek cytoplazmy. Do stejných oblastí lokalizoval homolog konzervovaného kinetochorového proteinu Nuf2, HIM-10, jehož snížená koncentrace vede k chromozomovým nondisjunkcím (Howe et al., 2001). Podobná fibrilární struktura byla detekována i u monocentrických chromozomů, a to v některých somatických buňkách obratlovců (McEwen et al., 1998). Je možné, že se jedná o další strukturu kinetochoru vyskytující se u monocentrických a holokinetických chromozomů nebo že klasická trilaminární podoba vzniká použitím chemické fixace, kdy v důsledku dehydratace dochází k zmenšení velikosti chromozomů (Howe et al., 2001; Jensen a Bajer, 1969).

4.2 Molekulární stavba

Převážná většina studií zabývajících se molekulární stavbou holokinetických chromozomů byla prováděna pouze na háďátku. I přes strukturní rozdíly klasických centromer a holocentromer byly u háďátka nalezeny geny pro homologní komponenty lokalizovaných centromer a kinetochorů, jako například pro centromerický histon H3 (CENH3) či protein vnitřního kinetochoru (CENP-C), které nacházíme u zbytku eukaryot. Naznačuje to stejné principy molekulární stavby, mechanismu sestavení a funkce oblastí vázajících mikrotubuly

a kinetochorů (Oegema et al., 2001). Je možné, že to platí pro všechny organismy s holokinetickými chromozomy obecně, ale k potvrzení jsou nutné další studie na jiných skupinách s holokinetickou strukturou chromozomů.

4.2.1 Repetitivní sekvence

Klasické centromery monocentrických organismů jsou většinou obohaceny o vysoce repetitivní sekvence DNA. Tato centromerická DNA se vyznačuje vysokou variabilitou, která spočívá hlavně v celkovém množství a v celkové délce repetice, uspořádání repetice a v nukleotidové sekvenci repetice (Garrido-Ramos, 2017; Ma et al., 2007). Pozice a funkce centromery většiny monocentrických chromozomů není závislá na sekvenci DNA, ale je určována epigeneticky (Henikoff et al., 2001; Musacchio a Desai, 2017). U většiny doposud popsaných organismů se v centromerách vyskytuje CENH3, který je proto využíván jako marker centromer (Henikoff et al., 2001).

U některých holokinetických organismů nebyly repetitivní sekvence typické pro holocentromeru vůbec pozorovány. To spolu se značnou velikostí oblasti, se kterou interagují mikrotubuly u holokinetických chromozomů (např. u háďátka) a do kterých se může začlenit CENH3, ukazuje na nepravděpodobnost existence jediné sekvence, která by podkládala holocentromery. Tyto výsledky svědčí spíše pro epigenetické určení pozice většiny holocentromer (Heckmann et al., 2013; Gassmann et al., 2012), stejně jako je tomu u centromer monocentrických chromozomů (Henikoff et al., 2001; Musacchio a Desai, 2017).

U některých šáchorovitých rostlin (šáchorovité mají holokinetické chromozomy) byly ale nalezeny repetitivní sekvence specifické pro holocentromeru, které se vyskytovaly v oblastech s CENH3 (Marques et al., 2015; Ribeiro et al., 2017). U monocentrických chromozomů se vyskytují vysoce repetitivní sekvence specifické pro centromeru v interfázním jádru v klastrech stejně tak, jako v průběhu buněčného cyklu (Kurek a Matsumoto, 1995). U zkoumaných šáchorovitých rostlin byly vysoce repetitivní sekvence specifické pro holocentromeru pomocí fluorescenční in situ hybridizace pozorovány v malých shlucích, rovnoměrně rozmístěných v celém interfázním jádru a při přechodu do mitózy docházelo k jejich asociaci (Marques et al., 2015; Ribeiro et al., 2017). U holokinetické rostliny biky sněhobílé (*Luzula nivea*) z čeledi sítinovitých byl izolován satelit LCS1. Do oblastí s LCS1 byla lokalizována protilátka proti proteinu SKP1, který se u monocentrických chromozomů vyskytuje v oblasti centromer (Houben a Schubert, 2003). Proto by satelit LCS1 mohl být

specifický pro holocentromeru. Tento satelit byl v interfázním jádru lokalizován v několika jednotlivých oblastech a při vstupu do dělení docházelo k jejich asociaci (Haizel et al., 2005).

4.2.2 Centromerická varianta histonu H3, CENH3

Rodina histonů H3 se skládá z několika variant, které se většinou liší pouze o několik aminokyselin. Jednou z těchto variant je již zmíněná varianta histonu H3, specifická pro centromery, která je jednou z nejdůležitějších molekul vnitřního kinetochoru. Tato varianta typická pro chromozomové oblasti vážící mikrotubuly byla nalezena u většiny studovaných organismů. Další důležitou vlastností CENH3 je, že u většiny eukaryot je nutná k navázání dalších kinetochorových proteinů, a tedy k správnému sestavení kinetochoru (Blower et al., 2002; Oegema et al., 2001).

Kanonický histon H3 a CENH3 se liší v sekvenci i v délce N-konce histonu. Dále má CENH3 oproti kanonickému histonu H3 více divergentní vnitřní histonovou doménu a o 2–3 aminokyseliny delší loop1 oblast, kde dochází ke kontaktu histonu H3 s DNA (Malik a Henikoff, 2001; Shelby et al., 1997). Jako kanonický histon označujeme variantu histonu, jejíž exprese probíhá převážně v S fázi buněčného cyklu a při DNA replikaci tvoří převážnou část přítomných histonů (Weber a Henikoff, 2014). Sekvence vnitřní domény kanonického histonu H3 a jeho varianty specifické pro centromerické oblasti histonu jsou shodné jen z 35–50 %. Pro porovnání histony H3 odlišných organismů z této sekvence sdílejí více než 75 % (Biterge a Schneider, 2014; Malik a Henikoff, 2001; Shelby et al., 1997).

U šáchorovité rostliny s holokinetickými chromozomy, biky sněhobílé (*Luzula nivea*), byla nalezena centromerická varianta histonu H3, LnCENH3. Metodou imunobarvení, za použití protilátky proti LnCENH3, byla zobrazena lokalizace tohoto proteinu. Výsledky ukazují, že holocentromera má u těchto rostlin difúzní podobu (Nagaki et al., 2005). U hádátka byl také izolován centromerický histon H3 (CeCENP-A) a za využití protilátek byla analyzována distribuce tohoto proteinu na chromozomu. Výsledky opět naznačují difúzní podobu holocentromery (Buchwitz et al., 1999; Oegema et al., 2001).

U velkých holokinetických chromozomů síťovitých a šáchorovitých rostlin byl pozorován na vnějších stranách chromatid žlábek, do kterého byl lokalizován CENH3. Vlákna dělicího vřeténka se neupínala dovnitř žlábků, ale na jeho okraje, podobně jako u monocentrických chromozomů. Jedním z možných vysvětlení je, že by se mohlo jednat o přizpůsobení zvyšující stabilitu vazby mikrotubulů na chromozom. Uvnitř žlábků byla pozorována

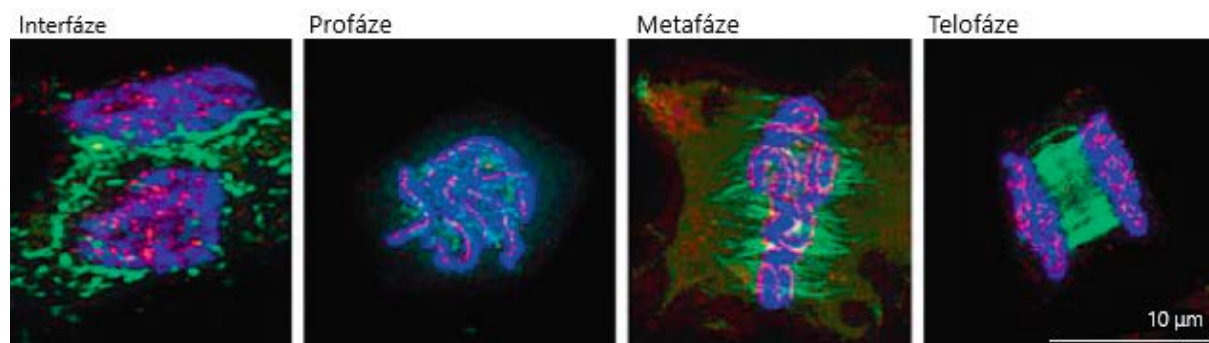
fibrilární síť, jejíž funkce zatím nebyla objasněna (Heckmann et al., 20011; Marques et al., 2015; Nagaki et al., 2005; Wanner et al., 2015).

Je zajímavé, že CENH3 u některých organismů s holokinetickými chromozomy patrně chybí. To bylo pozorováno u některých skupin hmyzu. Vzhledem k potřebě CENH3 k správné segregaci u monocentrických chromozomů a přítomnosti CENH3 u jiných holokinetických organismů to autoři vysvětlují vznikem centromerického proteinu během evoluce po přechodu k holokinetické stavbě, který by umožnil segregaci chromozomů i bez přítomnosti CENH3, čímž by byl odstraněn selekční tlak pro udržení CENH3 v genomu (Drinnenberg et al., 2014).

4.2.3 Změny hodnoty centromerické varianty histonu H3 v průběhu buněčného cyklu

U monocentrických chromozomů jsou proteiny vnitřní vrstvy kinetochoru přítomny po celou dobu buněčného cyklu a slouží jako epigenetická značka pozice centromery. Centromerický histon H3 sám o sobě není schopen zajistit správnou pozici a funkci centromery. Na vymezení aktivní centromery se podílejí další faktory jako stavba přilehlého chromatinu a sekvence DNA (McKinley a Cheeseman, 2016).

U holokinetických rostlin z čeledi sítinovitých (*Luzula nivea* a *L. elegans*) bylo pozorováno difúzní rozložení CENH3 během celé mitózy, tedy od profáze až do telofáze. Během interfáze byl zaznamenán pokles hodnoty CENH3. Místo souvislého rozložení v interfázním jádru, jak bychom mohli čekat na základě rozložení CENH3 na mitotických chromozomech, byl centromerický histon pozorován jen v několika jednotlivých oblastech (obr. 2). Autoři studie se domnívají, že minimální hodnota CENH3 v interfázi by mohla sloužit jako epigenetická paměť, která by později v buněčném cyklu mohla umožnit navázání dalších CENH3 na chromozom (Heckmann et al., 2011; Nagaki et al., 2005).



Obr. 2: Holokinetické chromozomy sítinovité rostliny *Luzula elegans* v různých stádiích buněčného cyklu zobrazené fluorescenčním mikroskopem. Chromozomy barvené DAPI jsou zobrazeny modře, CENH3 je zobrazen červeně a alfa tubulin je zobrazen zeleně. V interfázi je CENH3 přítomen v jasně odlišitelných shlucích

rovnoměrně rozmístěných v celém jádru. V profázi se CENH3 začíná shlukovat a tvoří přerušovanou linii podél většiny délky chromozomu. V metafázi CENH3 již tvoří nepřerušovanou linii. V telofázi dochází k dekonenzaci chromozomů, CENH3 signál se vyskytuje v mnoha jednotlivých shlucích na chromozomu. Tubulin značí vznikající fragmoplast. Převzato a upraveno podle Heckmann (2011).

Podle Gassmanna (2012) není u hádátka, které má holokinetické chromozomy, nutná přítomnost molekul CeCENP-A (centromerické varianty histonu H3 hádátka) k doplnění nových CeCENP-A. Identita holocentromery by tedy nemusela být určována pouhou přítomností již existujících CENH3, podobně jako je tomu u monocentrických chromozomů.

Při sníženém množství CENH3 v interfázi hádátka se do stejných míst, kde byl v jaderném dělení lokalizován, váží částice menší než nukleozomy, o některých z nichž je známo, že jsou transkripčními faktory. V genomu hádátka byla pozorována shoda mezi rozmístěním úseků CENH3 v mitóze a některých HOT (z anglického high occupancy target) úseků v interfázi. HOT úseky jsou úseky na chromozomu, na které se s nízkou afinitou váží transkripční faktory. Je tedy možné, že vazba těchto transkripčních faktorů v interfázi zabraňuje vazbě kanonických histonů, a tím umožní navázání nových CENH3 na počátku profáze (Steiner a Henikoff, 2014).

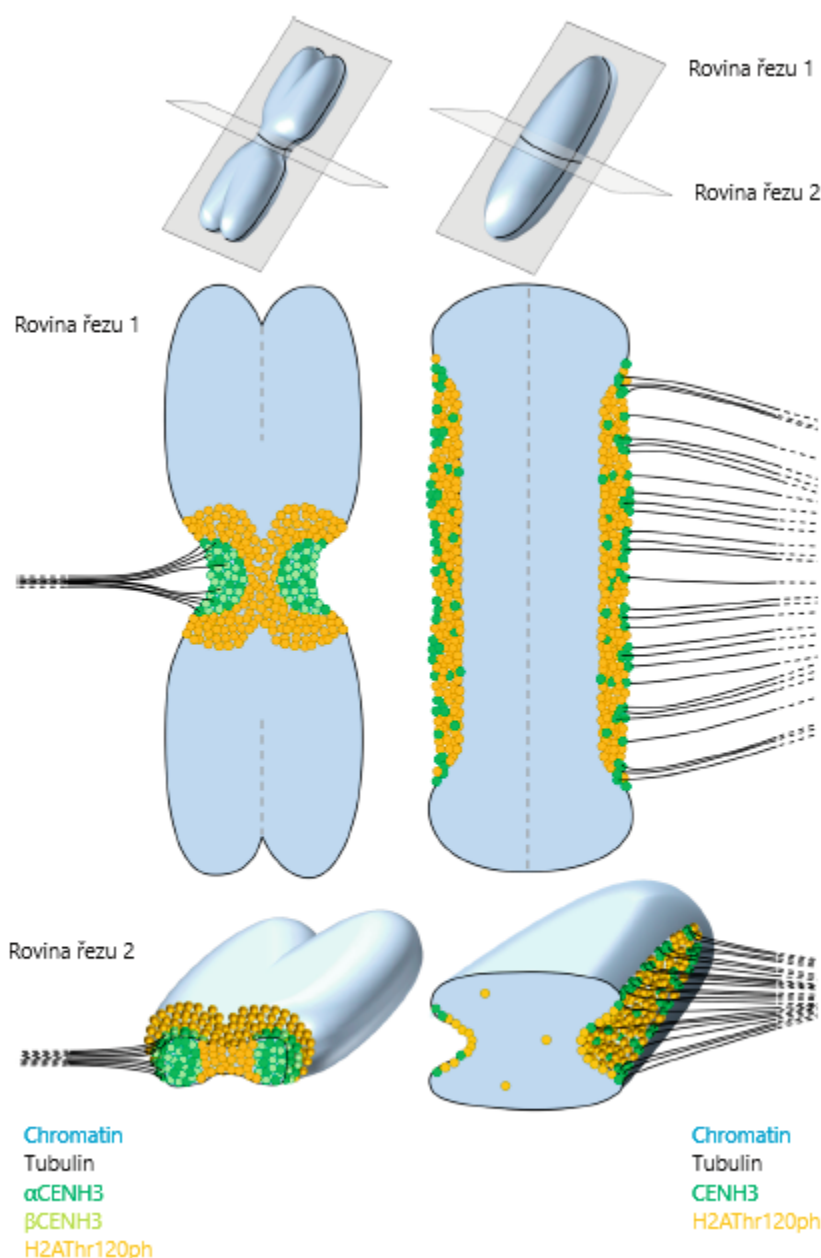
Příčina změny množství a rozložení CENH3 v průběhu buněčného cyklu holokinetických chromozomů zůstává neobjasněna. Domnívám se, že ke změně rozložení a množství CENH3 by mohlo docházet proto, aby byla v interfázi možná transkripce úseků, v kterých byl v mitóze lokalizován CENH3. Můj názor vychází z toho, že do míst, která byla v mitóze obohacena o CENH3, se v interfázi váží transkripční faktory.

4.2.4 Fosforylace threoninu 120 histonu H2A, H2AThr120ph

Specifickou modifikací centromerického chromatinu rostlin, která se využívá jako centromerický marker, je fosforylace threoninu histonu H2A (dále jen H2AThr120ph). U monocentrickým chromozomů je takto modifikovaný chromatin přítomný v centromerických a pericentromerických oblastech, kde se vyskytuje v oblastech chromatid odvrácených od buněčného pólu, a tedy vnitřně od oblastí s centromerickou CENH3, do kterých se při buněčném dělení upínají vlákna mikrotubulů. Oblasti s H2AThr120ph a oblasti s CENH3 jsou od sebe u monocentrických chromozomů jasně odlišeny a neprolínají se. Oblasti sesterských chromatid, ve kterých se vyskytuje H2AThr120ph, na sebe navazují.

U holokinetických chromozomů se H2AThr120ph i CENH3 vyskytují v struktuře vnějšího žládku, která byla pozorována u velkých holokinetických chromozomů rostlin. Oproti

chromozomům monocentrickým tyto histony nejsou odděleny do samostatných celků a prolínají se. Vlákná dělicího vřeténka se stejně jako u monocentrických chromozomů upínají pouze do oblastí s CENH3. Výskyt H2AThr120ph je omezen na vnější žlábek chromozomu a oblasti sesterských chromatid, ve kterých se vyskytuje, na sebe nenavazují (obr. 3). Proto zřejmě není zapojen do jejich koheze, i když bychom to z rozložení této modifikace u monocentrických chromozomů mohli předpokládat (Demidov et al., 2014; Wanner et al., 2015).



Obr. 3: Model rozložení CENH3 a H2AThr120ph monocentrických (vlevo) a holokinetických (vpravo) chromozomů rostlin. Znázorněný monocentrický chromozom ječmene má dvě centromerické varianty histonu

H3, alfa a beta, které se vyskytují společně ve stejné oblasti v primární konstriktci a upínají se do nich vlákna mikrotubulů (tubulin). Oblast s CENH3 je jasně oddělena od oblasti s fosforylovaným histonem H2A, který se vyskytuje vnitřně od CENH3 a oblasti sesterských chromatid, ve kterých se vyskytuje na sebe navazují. U holokinetického chromozomu biky se CENH3 i H2AThr120ph vyskytují ve vnějším žlábků, který je umístěn na většině povrchu strany chromatidy přivrácené k pólu buňky. CENH3 a H2AThr120ph se vyskytují ve vnějším žlábků společně a nejsou od sebe jasně odděleny do samostatných celků. Oblasti sesterských chromatid s H2AThr120ph na sebe nenavazují. Mikrotubuly se upínají pouze do oblastí s CENH3 a na příčném řezu vidíme, že se upínají převážně na kraje vnějšího žlábků. Převzato a upraveno podle Wanner et al. (2015).

4.2.5 Sestavení kinetochoru

Jak bylo již dříve naznačeno, i přes značnou sekvenční diverzitu centromerické DNA nacházíme hodně konzervovaných proteinů centromericko-kinetochorového komplexu, a to jak u monocentrických, tak u holokinetických chromozomů. Kromě CENH3, se jedná například o protein vnitřního kinetochoru CENP-C, protein zajišťující v mitóze regulaci dynamiky konců mikrotubulů MCAK a kinázu Bub1, která se podílí na regulaci mitotického kontrolního bodu (Oegema et al., 2001).

Proces sestavení kinetochoru u monocentrických chromozomů zatím není zcela objasněn. U monocentrických organismů jsou proteiny vnitřního kinetochoru, označované jako CCAN (z anglického constitutive centromere associated network), přítomny po celou dobu buněčného cyklu, a proto je obtížné určit, jak a kdy jsou další složky kinetochoru navazovány na CENH3, který je nutný k sestavení kompletního kinetochoru.

Proces sestavení kinetochoru u háďátka se zdá být podobný jako u monocentrických chromozomů. Mohlo by tomu tak být i u ostatních organismů s holokinetickými chromozomy, jsou ale potřebné další studie, které by to ověřily. Vzhledem k výskytu konzervovaných proteinů centromericko-kinetochorového komplexu u háďátka a změny množství těchto proteinů mezi interfází a jaderným dělením by jeho studium mohlo usnadnit objasnění procesu sestavení kinetochoru u monocentrických organismů (Nagpal a Fukagawa, 2016; Oegema et al., 2001).

U monocentrických chromozomů byla v případě lokalizace proteinů centromericko-kinetochorového komplexu na chromozom *de novo* pozorována přímá vazba proteinu vnitřního kinetochoru CENP-C na CENH3. CENP-C zřejmě umožňuje navázání dalších proteinů vnitřního kinetochoru a zároveň se podílí na spojení vnějšího kinetochoru s centromerou (Nagpal a Fukagawa, 2016).

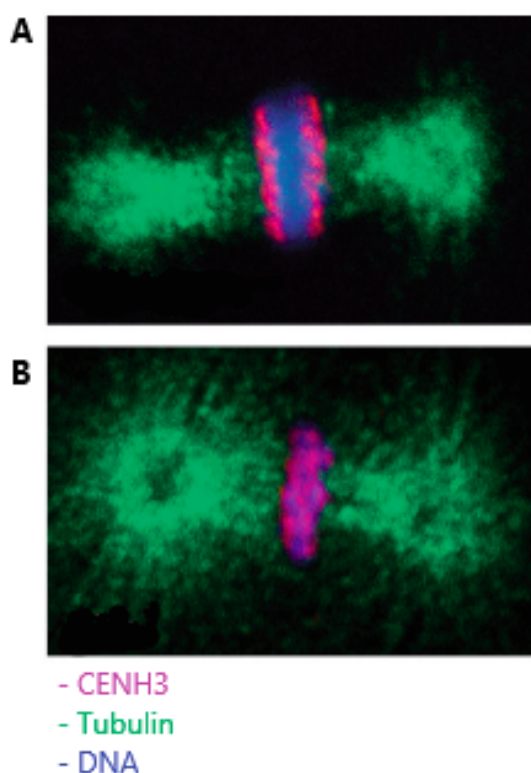
V embryích hádátka byl pozorován vztah mezi CeCENP-A (centromerická varianta histonu H3 hádátka) a CeCENP-C (homolog proteinu vnitřního kinetochoru CENP-C hádátka). Centromerický histon H3 je u hádátka, stejně jako u monocentrických chromozomů, nutný k sestavení kompletního kinetochoru. V případě, že CeCENP-A není přítomný, nedojde v mitóze k lokalizaci CeCENP-C na chromozom, a nedojde tedy k správnému sestavení kinetochoru. Histon CeCENP-C je však stále přítomný v jádru, takže CeCENP-A je nutný pouze k jeho správnému navázání na chromozom, ale ne k jeho stabilizaci.

Bez přítomnosti proteinů CeCENP-A či CeCENP-C nedojde v mitotickém dělení k lokalizaci proteinů CeBub1 (homolog kinázy Bub1 u hádátka) a CeMCAK (homolog proteinu MCAK u hádátka) na chromozom a k vytvoření kinetochoru. Nevytvoří se stabilní dělicí vřeténko a dochází k defektům v segregaci. I když proteiny CeBub1 a CeMCAK nebyly lokalizovány na chromozomu, byly stále přítomny v jádru. CeCENP-A/C jsou tedy nutné k lokalizaci těchto proteinů na chromozom při mitotickém dělení a tím k správnému vytvoření kinetochoru, ale již ne k jejich stabilizaci (Oegema et al., 2001).

V samčí meióze hádátka je sestavení kinetochoru zřejmě nezávislé na CeCENP-A, který je sice přítomný na chromozomu, ale při snížení jeho množství nedochází k závažným defektům meiotického dělení. Jak již bylo zmíněno, některé druhy hmyzu s holokinetickými chromozomy CENH3 zcela postrádají, a přesto u nich jsou přítomné složky kinetochoru jako NCD80 a MIS12. Zároveň dochází ke správné tvorbě kinetochoru a k správné segregaci chromozomů. To naznačuje, že si tyto druhy zvládly vytvořit cestu pro sestavení kinetochoru, která je nezávislá na CENH3. Zda to souvisí s holokinetickou stavbou chromozomu, zatím není známo (Drinnenberg et al., 2014; Monen et al., 2005).

U hádátka jsou sestavení kinetochoru a následná správná segregace dále zřejmě ovlivněny i krátkými RNA úseky (tzv. 22G-RNA). Dohromady jsou tyto krátké RNA úseky komplementární až k několika tisícům genů kódujících proteiny. Mechanismem souvisejícím s principem RNA interference, za využití proteinu Argonaut (u hádátka označovaného jako CSR-1), dochází k interakci těchto malých RNA s euchromatinovými doménami, ke kterým jsou komplementární. V místech, do kterých se na základě komplementarity vázaly CSR-1 22G-RNA komplexy byla nižší hodnota CENH3. Autoři studie navrhli, že vazba komplexu CSR-1 22G-RNA by mohla umožnit vazbu enzymů modifikujících chromatin. Tyto enzymy by se mohly podílet na ohraničení euchromatinových úseků, do kterých se nebude vázat CENH3, a napomoci správnému sestavení kinetochoru, který by měl podle holokinetického

modelu tyto oblasti překlenout. K biogenezi malých 22G-RNA interagujících s CSR-1 jsou zapotřebí Argonaut protein CSR-1, helikáza DRH-3, protein EKL-1 a RNA dependentní RNA polymeráza EGO-1. V embryích háďátka s malým množstvím těchto faktorů nebo bez nich je sice CENP-A lokalizován na chromozomech, ale je lokalizován odlišně než za normálních okolností. Není na většině povrchu chromatid přivracených k pólu v jasně definovaných oblastech podkládajících holocentromeru, ale místo toho je neorganizovaně lokalizován uvnitř chromatid. Kinetochory tedy nejsou orientovány směrem k pólům a chromozomy nejsou uspořádány do metafázní destičky (obr. 4). Stejné problémy se správnou lokalizací jsou při sníženém množství faktorů potřebných pro biogenezi 22-G RNA pozorovány u CeCENP-C, CeMCAK a CeBub1 a kondenzinových a kohezinových proteinů. To podporuje hypotézu, že komplexy CSR-1 22G-RNA přímo ovlivňují sestavení kinetochoru háďátka (Claycomb et al., 2009).



Obr. 4: Zobrazení metafáze mitotických chromozomů embryí háďátka s neredukovaným (A) a sníženým (B) množstvím proteinu CSR-1, což je jeden z faktorů nutných pro biogenezi krátkých RNA, které na základě komplementarity interagují s euchromatinovými úseky a zřejmě tak ovlivňují správné sestavení kinetochoru. (A) Centromerický histon CENH3 pokrývá většinu povrchu sesterských chromatid přivracených k buněčnému pólu. (B) V embryích se sníženým množstvím proteinu CSR-1 je CENH3 rozptýlen uvnitř sesterských chromatid. Převzato a upraveno podle Claycomb (2009).

U některých monocentrických organismů jako např. u kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* dochází podobným procesem k stabilizaci centromery při mitotickém dělení. V tomto případě jsou však krátké RNA komplementární k DNA heterochromatinových pericentromerických oblastí, které jsou bohaté na repetitivní sekvence (Bühler a Gasser, 2009), a ne k euchromatinovými úsekům jako je tomu u hádátka (Claycomb et al., 2009).

Z měření Gassmanna (2012) vyplývá, že u hádátka je množství CeCENP-A poměrně nízké – jeho molekuly by pokryly pouze čtyři procenta celého genomu. Steiner a Henikoff (2014) proto navrhli pro hádátka polycentrický model holokinetické stavby chromozomů. Určili místa, ve kterých byla nejvyšší koncentrace jak CeCENP-A, tak i kinetochorových komponent. Počet těchto oblastí, vhodných pro připojení aparátu dělicího vřeténka, stanovili na ~100 na chromozom. Podle mého názoru je ale možné, že se mezi oblastmi s CENH3 chromatinem vyskytuje chromatin obohacený o jinou centromerickou variantou histonu, jak tomu je například u některých zástupců sítinovitých a šáchorovitých rostlin, které mají také holokinetické chromozomy (viz obr. 3).

Pokud by u hádátka platil polycentrický model, tak by se komplexy CSR-1 22-G RNA neuplatňovaly v překlenutí euchromatinových úseků kinetochorem, jak navrhl Claycomb (2009). Podle mého názoru by se v takovémto případě mohly spíše podílet na ohraničení úseků, přilehlých k oblastem s CENH3, podobně jako je tomu u monocentrických organismů.

4.3 Centromerický a holokinetický tah

Model centromerického tahu spočívá v tom, že v případě zvýšení počtu centromerických nukleozomů (například expanzí centromerických satelitů, které mají schopnost ovlivnit pozici CENH3) by došlo k rozšíření úseků vhodných pro vazbu mikrotubulů, což by vedlo ke vzniku silnější centromery (Henikoff et al., 2001; Zhang et al., 2013). Přítomnost silnější centromery v asymetrické meióze (kdy je do dalších generací přenesen pouze jeden ze čtyř produktů meiózy) vede k její vyšší frekvenci v následujících generacích. Zároveň bude ale zvýšené riziko nondisjunkcí v symetrické meióze druhého pohlaví, které může vést k neplodnosti. Mutace v CENH3, která by měla za následek vazbu k slabší centromeře, by tuto zvýšenou frekvenci nondisjunkcí snížila a byla by pozitivně selektována. Taková evoluce CENH3, která je nutná k potlačení chromozomových nondisjunkcí, by měla být pozorována u všech organismů s asymetrickou meiózou (Henikoff et al., 2001; Malik a Henikoff, 2001).

Adaptivní evoluce CENH3 na rychle se měnící repetitivní sekvence centromery by neměla být pozorována u organismů se symetrickou meiózou, ale ani i u organismů s asymetrickou meiózou a holokinetickými chromozomy. Jelikož u holokinetických chromozomů jsou kinetochorové proteiny již na většině chromozomu, tak ovlivnění pozice CENH3 jedinou sekvencí DNA není pravděpodobné. U holokinetické rostliny z čeledi šáchorovitých nebyla skutečně pozorována pozitivní selekce CENH3. To by mohlo znamenat, že difúzní rozložení proteinů centromericko-kinetochorového komplexu vzniklo jako obrana proti výše popsanému centromerickému tahu. Centromerický tah je formou meiotického tahu a bylo by tedy možné, že by k jeho potlačení stačila holokinetická struktura pouze v průběhu meiózy (Zedek a Bureš, 2016). Jedná se o jeden z možných důvodů vzniku holocentromer. Holokinetická stavba chromozomů dává možnost uplatnění jiného tahu, a to tahu holokinetického.

V čem spočívá holokinetický tah? Jak bylo pojednáno v první kapitole, difúzní podoba holocentromer, zajišťující vyšší toleranci holokinetických chromozomů k chromozomovým rozpadům a fúzím (Hipp et al., 2009; Kuta et al., 2004), umožňuje rychlou evoluci holokinetických karyotypů. To je patrné na široké a téměř kontinuální škále počtu chromozomů v rámci druhu i mezidruhově. Zároveň byla u holokinetických organismů pozorována silná korelace (pozitivní i negativní) mezi počtem chromozomů a velikostí genomu (Bureš et al., 2013; Escudero et al., 2015; Yano a Hoshino, 2006).

Tato korelace by mohla být vysvětlena právě holokinetickým tahem. Model holokinetického tahu byl navržen jako modifikace meiotického tahu u holokinetických chromozomů, u kterých nemůže docházet k rozšíření holocentromery, a tak jsou preferenčně selektovány velké či malé chromozomy. Holokinetický tah je založen na negativní korelaci mezi počtem chromozomů a velikostí genomu. V případě, že jsou preferenčně děděny menší z homologních chromozomů, dochází ke štěpení chromozomů a / nebo k odstraňování repetitivní DNA. Naproti tomu v případě, že jsou preferenčně děděny chromozomy větší, dochází k chromozomovým fúzím a / nebo k zvýšení množství repetitivní DNA (Bureš a Zedek, 2014).

Kromě negativní korelace byla nalezena i pozitivní, popř. žádná korelace mezi počtem chromozomů a velikostí genomu holokinetických chromozomů. Escudero (2015) tvrdí, že i pozitivní korelace může být v souladu s modelem holokinetického tahu. Například v případě, kdy dochází k pozitivní selekci pro vyšší míru rekombinace, by mohly být preferovány

rozpady chromozomů a zároveň proliferace repetitivních DNA sekvencí chromozomů (Escudero et al., 2012).

5 Ribozomové DNA

Na chromozomech nacházíme oblasti rDNA, které kódují geny pro ribozomovou RNA. Klastry 45S rDNA se často nacházejí v terminálních částech chromozomu a po jejich přepsání vzniká transkript, který je štěpen a vznikají transkripty pro 18S, 5.8S a 28S rRNA. U monocentrických chromozomů je klastř 45S rDNA lokalizován v tzv. sekundární konstrikci a tuto oblast označujeme jako organizátor jadérka. Geny pro 5S ribozomální RNA se nacházejí v jiných oblastech než klastry 45S rDNA (McStay a Grummt, 2008).

U šáchorovitých a sítinovitých rostlin s holokinetickými chromozomy byly 45S rDNA repete pozorovány v terminálních oblastech, ale nebyly uloženy v konstrikci chromozomu. Klastry 5S rDNA byly pozorovány nejen v terminálních, ale i v intersticiálních oblastech, a jejich množství nebylo tak variabilní jako množství 45S rDNA (Guerra a García, 2004; Heckmann et al., 2011; da Silva et al., 2010; Vanzela et al., 2003).

V případě intersticiální pozice 45S klastř by zřejmě byla zachována funkční vazebná doména pro mikrotubuly na obou koncích chromozomu díky difúzní podobě kinetochoru. V tomto případě by vzhledem k nižší kondenzaci 45S klastř mohlo docházet přednostně k zlomům chromozomů v této oblasti. Takto by mohla být vysvětlena preferenční lokalizace 45S klastřů v terminálních oblastech holokinetických chromozomů (Heckmann et al., 2011). U některých druhů motýlů (Lepidoptera) s holokinetickými chromozomy bylo ale pozorováno intersticiální umístění 18S rDNA, a tedy potencionálně i 45S rDNA. V některých případech k tomu zřejmě mohlo dojít fúzí chromozomů s terminálně uloženou 45S rDNA, jelikož u holokinetických chromozomů nevznikají nestabilní dicentrické chromozomy díky difúzní podobě vazebné domény pro mikrotubuly. V ostatních případech byla pozorována expanze rDNA klastřů na nová místa chromozomu, aniž by došlo ke změně počtu chromozomů. To znamená, že musí existovat i jiný mechanismus, než chromozomové fúze, který umožňuje přemístování klastřů rDNA. Autoři to vysvětlují mechanismem společným pro holokinetické i monocentrické chromozomy, konkrétně ektopickou rekombinací, tj. rekombinací mezi repetitivními sekvencemi nehomologních chromozomů. Intersticiální pozice 45S klastř rDNA by pak byla důsledkem tohoto procesu (Nguyen et al., 2010).

6 Procesy chromozomové koheze, kondenzace a segregace u organismů s holokinetickými chromozomy

Mezi děje nezbytně nutné k správné segregaci při jaderném dělení patří bezchybné sestavení kinetochoru a standardní lokalizace kondenzinů a kohezinů. Je nutné zdůraznit, že převážná většina studií zabývajících se molekulární podstatou těchto procesů, byla u holokinetických organismů prováděna pouze na hádátku. V některých případech je tedy otázkou, zda odlišnosti nalezené u hádátka platí po všechny organismy s holokinetickými chromozomy. To vyřeší teprve studie u dalších organismů s touto stavbou chromozomů.

6.1 Koheze

Kohezi sesterských chromatid zajišťují kohezinové komplexy tvořené SMC proteiny, Smc1 a Smc3, a dalšími proteiny, jako Scc1 a Scc3. Proteiny Smc1 a Smc3 tvoří heterodimer, který je uzavřen do prstencové struktury pomocí kleisinu Scc1, na který je navázán protein Scc3. Princip koheze sesterských chromatid v mitotickém a meiotickém dělení je v zásadě stejný. Kohezinové komplexy obemknou sesterské chromatidy, čímž zajistí jejich spojení. V meióze jsou koheziny součástí axiálního elementu, což je struktura tvořící se mezi sesterskými chromatidami na počátku leptotene, zajišťující jejich soudržnost. Mezi axiálními elementy se v zygotene tvoří centrální element a z axiálních elementů se stávají laterální elementy. Tyto části spolu vytváří synaptonemální komplex, zajišťující párování homologních chromozomů. Tyto struktury a proteiny z kterých jsou složeny, jsou u monocentrických a holokinetických chromozomů konzervované (Cahoon a Hawley, 2016; Onn et al., 2008).

U holokinetického organismu hádátka byly nalezeny homology všech proteinů kohezinového komplexu. Podjednotka Scc1 má u hádátka čtyři homologní proteiny, včetně proteinu Rec8, který zřejmě funguje specificky v průběhu meiózy (Nasmyth a Haering, 2005; Pasierbek et al., 2001).

V mitotickém dělení holokinetických chromozomů jsou sesterské chromatidy spojeny po celé své délce pomocí stejných konzervovaných kohezinových proteinů, které se uplatňují v meióze. V případě malého nebo žádného množství těchto faktorů dochází k problémům v segregaci (Maddox et al., 2004; Mito et al., 2003).

V meiotickém dělení je nutná dvoukroková ztráta koheze. U monocentrických chromozomů většinou dochází k desynapsi homologních chromozomů v anafázi I a k ztrátě koheze mezi sesterskými chromatidami v anafázi II. Koheze mezi sesterskými chromatidami musí být tedy

v meióze I ochráněna. To se děje pomocí shugoshinů, které v centromere vytvářejí komplex s fosfatázou 2A (PP2A), a tím zabraňují separáze v odstranění kohezínů v centromere. Na udržení koheze se podílí Haspin kináza vazbou na regulační protein Pds5 a zřejmě i konzervovaná Aurora B kináza (AIR-2) tím, že udržuje PP2A v centromere (Watanabe a Kitajima, 2005; Yu a Koshland, 2007; Zhou et al., 2017)

U holokinetických chromozomů nacházíme různé typy meiotického dělení, které se liší posloupností redukčního a ekvačního dělení, popř. polohou kinetochoru. Různé typy meiózy vykazují specifické rozložení kohezínů.

6.1.1 Pre-redukční dělení

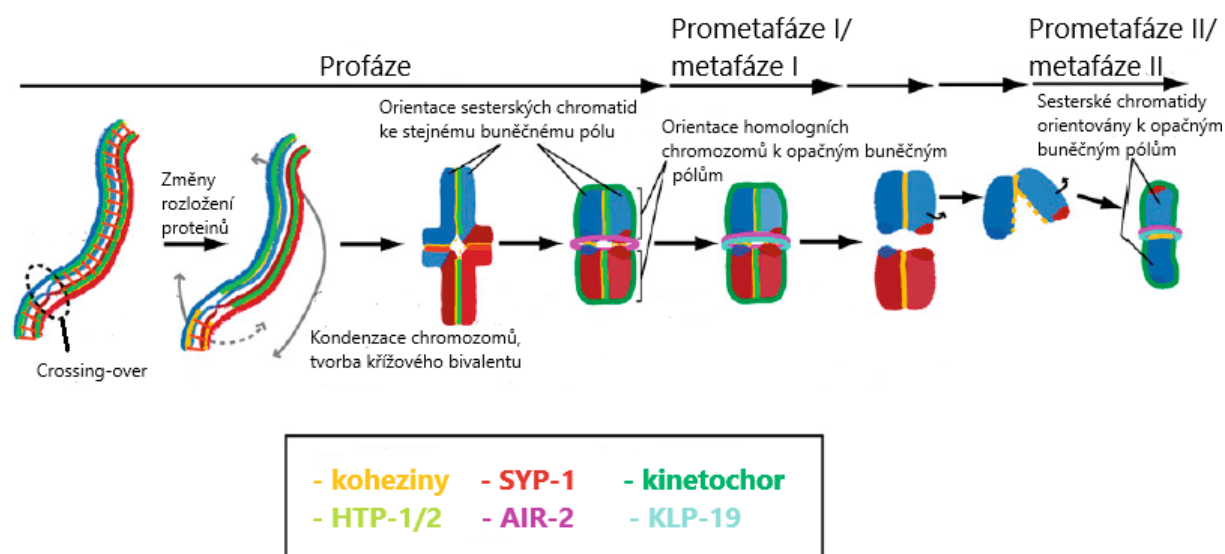
Při pre-redukčním dělení dochází v meióze I k segregaci homologních chromozomů, podobně jako v meióze organismů s monocentrickými chromozomy. V tomto případě je kinetochor organizován jiným způsobem než v mitóze. Pokrývá celý chromozom s výjimkou středové oblasti křížového bivalentu, což zajišťuje orientaci homologních chromozomů k opačným pólům a jejich rozchod (Ferrandiz et al., 2018; Howe et al., 2001). V některých případech kinetochor zřejmě chybí, vlákna dělicího vřeténka se napojují do malé oblasti v telomerické části chromozomu (Suja et al., 2000). Pre-redukční meióza se vyskytuje např. u některých zástupců holokinetických hlístic (Howe et al., 2001) a ploštic (Suja et al., 2000). Výzvou pro organismy s holokinetickými chromozomy, které podstupují pre-redukční meiózu, je nutnost protekce koheze chromatid na většině povrchu až do anafáze II.

U hádátka, které podstupuje pre-redukční meiózu, je crossing-over klíčovým procesem, který určuje, ve kterých oblastech bude koheze zachována a kde bude ztracena. Obvykle pozorujeme crossing-over jenom jeden a to většinou v terminální třetině chromozomu. V důsledku crossing-overu dochází k tvorbě křížového bivalentu, přičemž delší ramena směřují k pólům buňky (Barnes et al., 1995; Martinez-Perez et al., 2008).

V závislosti na poloze crossing-overu u hádátka dochází v pozdní fázi pachytene ke změně rozložení proteinů původně lokalizovaných v synaptonemálním komplexu. Proteiny synaptonemálního komplexu jako SYP-1 a SYP-2, které byly doposud lokalizovány po celé délce mezi homologními chromozomy, se přesouvají do krátkých ramen křížového bivalentu. Vysoce konzervované proteiny rodin HORMA, HTP-1 a HTP-2, které jsou částí axiálního elementu synaptonemálního komplexu, a do této chvíle byly rovněž po celé délce mezi sesterskými chromatidami, se přesouvají do dlouhých ramen bivalentu

(Martinez-Perez et al., 2008; Nabeshima et al., 2005). Se zvyšující se kondenzací bivalentu dochází k nahrazení proteinů SYP jinou skupinou proteinů obsahující mimo jiné AIR-2 (obr. 5). Jako značka pro lokalizaci AIR-2 slouží fosforylace threoninu histonu H3 (H3 pT3), závislá na aktivitě Haspin kinázy. Ke ztrátě soudržnosti v krátkých ramenech dochází fosforylací proteinu Rec8, který je v těchto ramenech lokalizován, Aurora B kinázou (Ferrandiz et al., 2018; Rogers et al., 2002).

V dlouhých ramenech bivalentu je koheze zachována omezením fosforylace v pozici H3T3. Omezení fosforylace H3T3 se děje pomocí HTP-1/2 proteinů, které umožňují vazbu proteinu LAB-1. Protein LAB-1 zřejmě umožňuje vazbu a šíření protein fosfatázy 1 (PP1), která defosforyluje threonin histonu H3. Omezení fosforylace H3T3 v dlouhých ramenech křížového bivalentu znamená, že v nich není lokalizována AIR-2. Nedochází tak k fosforylaci proteinu Rec8 a koheze je v dlouhých ramenech bivalentu zachována (de Carvalho et al., 2008; Ferrandiz et al., 2018; Rogers et al., 2002).



Obr. 5: Model změny rozložení proteinů v meióze v závislosti na poloze crossing-overu. V časně fázi pachytene jsou proteiny synaptonemálního komplexu SYP-1 lokalizovány mezi homologními chromozomy a proteiny axiálního elementu HTP-1/2 mezi sesterskými chromatidami. V pozdní pachytene dochází k změně rozmístění těchto proteinů v závislosti na poloze crossing-overu. Proteiny SYP se přesouvají do oblastí mezi crossing-overem a nejbližším koncem chromozomů, naopak HTP-1/2 proteiny se přesouvají do oblastí mezi crossing-overem a vzdálenějším koncem chromozomů. Dochází k tvorbě křížového bivalentu, kde jsou SYP proteiny lokalizovány do krátkých ramen a HTP-1/2 proteiny do dlouhých ramen bivalentu. Se zvyšující se kondenzací bivalentu jsou SYP proteiny v krátkých ramenech bivalentu nahrazeny jinou skupinou proteinů, obsahující AIR-2. Současně dochází k tvorbě kinetochorů, které pokrývají homologní chromozomy s výjimkou středové oblasti bivalentu. V pozdní profázi dojde k změně rozložení proteinu KLP-19, který byl doposud rozptýlen v celém bivalentu (nezobrazeno). V této fázi je KLP-19 v krátkých ramenech bivalentu. V anafázi I dochází

k rozchodu homologních chromozomů a k uvolnění proteinů HTP-1/2 z chromozomů. V meióze II dojde ke změně rozmístění AIR-2 a KLP-19 a k tvorbě kinetochorů pokrývajících sesterské chromatidy s výjimkou oblastí, kde je lokalizována AIR-2 a KLP-19. Převzato a upraveno podle Schvarzstein et al., (2010).

Aktivní Haspin kináza a AIR-2 tedy u háďátka vedou ke ztrátě koheze, zatímco u monocentrických chromozomů slouží k jejímu udržení (Yu a Koshland, 2007; Zhou et al., 2017). U monocentrických chromozomů je centromera důležitou oblastí jak pro udržení koheze sesterských chromatid, tak k určení orientace homologních chromozomů k opačným pólům buňky, zatímco u holokinetických chromozomů jsou tyto dva procesy odděleny do různých ramen bivalentu. V důsledku tohoto rozdílu zřejmě došlo k diferenciaci funkce AIR-2 tak, že u monocentrických organismů přispívá k zachování a u holokinetických organismů k ztrátě koheze (de Carvalho et al., 2008; Collette et al., 2011; Ferrandiz et al., 2018).

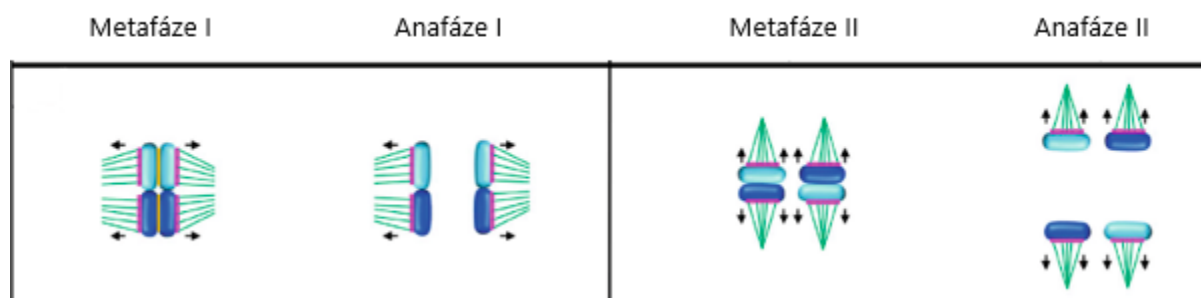
Udržení koheze do druhého meiotického dělení je u holokinetických chromozomů, které podstupují pre-redukční meiózu, nezávislé na shugoshinech. Shugoshin je ale protein s komplexní funkcí. Byť se u háďátka nepodílí na zajištění koheze, tak funkce kontroly správného napojení kinetochoru k mikrotubulům je zachována (de Carvalho et al., 2008; Ferrandiz et al., 2018).

U některých holokinetických chromozomů, které podstupují pre-redukční meiózu, je v meiotickém dělení vlastně zachován funkční monocentrismus, kdy k napojení mikrotubulů na chromozomy dochází v lokalizované (v tomto případě telomerické) oblasti chromozomu. To, který konec chromozomu je kineticky aktivní, je v obou meiotických děleních určeno náhodně (Papeschi et al., 2003; Pérez et al., 2000).

6.1.2 Post-redukční dělení

Dalším typem meiózy, který se vyskytuje u holokinetických chromozomů, je invertovaná neboli holokinetické meióza, která byla pozorována např. u některých zástupců šáchorovitých (Cabral et al., 2014) a sítinovitých rostlin (Heckmann et al., 2014) a mšic (Bongiorni et al., 2004). Tento typ dělení je post-redukční. Dlouhá ramena křížového bivalentu jsou orientována souběžně s rovinou metafázní destičky. V prvním meiotickém dělení tedy dochází k segregaci sesterských chromatid a jejich holocentromery se v průběhu meiózy I chovají jako nezávislé jednotky. K segregaci homologních chromozomů dochází až v meióze II, kdy se v anafázi II rozchází homologní nesesterské chromatidy. Při tomto

způsobu rozchodu se vlákna dělicího vřeténka upínají na většinu délky chromozomu s výjimkou koncových oblastí, podobně jako při mitotickém dělení (obr. 6).



Obr. 6: Model invertované meiózy. V meióze I dochází k rozchodu sesterských chromatid k opačným pólům buňky. V meióze II dochází k rozchodu nesesterských chromatid. V obou případech se vlákna dělicího vřeténka upínají na většinu povrchu chromozomů. Převzato a upraveno podle Heckmann et al., (2014).

V prvním meiotickém dělení dochází k celkové ztrátě koheze, spojení mezi homologními nesesterskými chromatidami je zachováno jen v koncových oblastech, a to díky zvláštním tenkým vláknům (šířka méně než $0,5 \mu\text{m}$), která jsou tvořena chromatinem a jsou obohacena o repetitivní DNA. Tvorba těchto spojení je nezávislá na chiasmatech (Cabral et al., 2014; Heckmann et al., 2014).

U sítinovité rostliny *Luzula elegans* dochází k invertované meióze, a tedy ke ztrátě koheze již v prvním meiotickém dělení. Jeden z kleisinů kohezinového komplexu byl pozorován v mitotické metafázi a v metafázích I i II v oblastech obohacených o CENH3. Podobná pozorování byla provedena i u monocentrických chromozomů se závěrem, že by se kleisin v těchto fázích dělení mohl podílet na orientaci chromozomů k opačným pólům buňky a sestavení vnitřní centromery chromozomů. Potencionálně by tedy mohl mít podobnou funkci i u chromozomů holokinetických (Herrán et al., 2011; Ma et al., 2016).

6.2 Kondenziny

Kondenzinové komplexy jsou tvořeny vysoce konzervovanými proteiny, jejichž homologы nacházíme u všech eukaryot. Tyto komplexy zajišťují kondenzaci chromozomů při vstupu do jaderného dělení. Tyto komplexy se mohou u různých organismů lišit lokalizací, což může souviset s tím, že v průběhu evoluce získaly další funkce. U vyšších eukaryot se tyto komplexy obvykle vyskytují dva, přičemž snížení koncentrace každého z nich má za následek specifické defekty (Hudson et al., 2009; Ono et al., 2003).

I přes velké strukturní rozdíly holokinetických a monocentrických chromozomů byly u holokinetických chromozomů hádátka a monocentrických chromozomů savců nalezeny některé společné charakteristiky, jako například obohacení centromer a holocentromer kondenzinem II, a dále to, že se nepřekrývají oblasti s kondenzinem I a II, jakož i časové odlišení lokalizace kondenzinu I a II na chromozom v mitóze i v meióze (Collette et al., 2011; Hirota et al., 2004; Ono et al., 2003).

U holokinetického organismu hádátka byl původně nalezen pouze kondenzin I^{PC} s unikátní funkcí v regulaci exprese a kondenzin II. Proto byl navržen model, ve kterém jsou v důsledku absence kondenzinu I a aktivity kondenzinu II holokinetické chromozomy více rigidní (Hagstrom et al., 2002; Ono et al., 2003; Stear a Roth, 2002). Později byly nalezeny kondenzinové komplexy tři: kondenzin II, kondenzin I a kondenzin I^{PC}. Kondenzin I^{PC} sdílí s kondenzinem I s jednou výjimkou všechny podjednotky a má unikátní funkci. Zatímco kondenziny I a II se podílí na správné kondenzaci chromozomů a segregaci při jaderném dělení, kondenzin I^{PC} se specificky váže na pohlavní chromozomy X u hermafroditů a reguluje jejich expresi tak, aby byla stejná jako jejich exprese u X0 samců (Csankovszki et al., 2009).

V mitóze hádátka kondenzin II kolokalizuje s CENH3, vyskytuje se tedy v oblasti holocentromery. Při snížení množství CENH3 nedojde k správné lokalizaci kondenzinu II na chromozom. Kondenzin I je rozmístěn na stranách chromatid odvrácených od buněčných pólů, tedy na stranách opačných, než kde je umístěn kondenzin II. Ve stejných oblastech jako kondenzin I je lokalizována AIR-2. V případě snížené koncentrace AIR-2 vůbec nedochází k lokalizaci kondenzinu I na chromozomy, avšak kondenzin II tím není zásadně ovlivněn, což bylo pozorováno i u savčích buněk s monocentrickými chromozomy a nejedná se tedy o specifikum holokinetických chromozomů (Chan et al., 2004; Collette et al., 2011; Lipp et al., 2007).

V meióze hádátka se kondenzin II opět vyskytuje v stejných oblastech jako CENH3, který na rozdíl od mitotického dělení není nutný pro lokalizaci kondenzinu II na chromozom. To dále potvrzuje nezávislost meiotického dělení hádátka na CENH3, o které jsme pojednávali na str. 18 (Chan et al., 2004; Collette et al., 2011; Monen et al., 2005). Kondenzin I je stejně jako AIR-2 lokalizován do krátkých ramen křížového bivalentu hádátka. Při snížení koncentrace AIR-2 v tomto případě sice dojde k lokalizaci kondenzinu I na chromozom, ale do obou ramen bivalentu. Mechanismus odpovědný za lokalizaci kondenzinu I na meiotické

chromozomy hádátka zatím není znám. Rozložení AIR-2 je u holokinetických chromozomů oproti monocentrickým chromozomům rozdílné. Přestože u monocentrických chromozomů AIR-2 lokalizuje do centromery a u holokinetických chromozomů do krátkých ramen bivalentu, tak se v obou případech jedná o ideální pozici pro kontrolu 1) orientace homologních chromozomů k opačným buněčným pólům a 2) orientace sesterských chromatid ke stejnému pólu (Collette et al., 2011; Hauf et al., 2007).

Kondenzin I hádátka je v průběhu prvního meiotického dělení mimo jiné lokalizován mezi homologní chromozomy a v průběhu druhého meiotického dělení mezi sesterské chromatidy. Toto rozložení kondenzinu I vedlo k hypotéze, podle které by se kondenzin I mohl účastnit procesu koheze při meiotickém dělení (Csankovszki et al., 2009).

6.2.1 Zvýšená rigidita holokinetických chromozomů jako prevence merotelického připojení dělicího vřeténka

Přítomnost kinetochoru na většině povrchu chromozomu holokinetických chromozomů zvyšuje pravděpodobnost merotelického připojení vláken dělicího vřeténka (jeden kinetochor je připojen k mikrotubulům z obou pólů), což může vést k aneuploidii. Podle jedné z hypotéz by problém merotelických připojení mikrotubulů mohl být vyřešen zvýšenou rigiditou holokinetických chromozomů. Ta by mohla zabránit ohýbání či rotaci částí chromozomů okolo jejich delší osy, což by jinak mohlo vést k merotelickému připojení mikrotubulů (Stear a Roth, 2002). Hypotéza vyšší rigidity holokinetických chromozomů je podpořena např. tím, že se po navázání mikrotubulů v mitóze nezvětšuje vzdálenost mezi sesterskými kinetochory (Desai et al., 2003).

Při snížení hladiny HCP-6, proteinu kondenzinového komplexu II, byly holokinetické chromozomy náchylnější k rotaci okolo jejich delší osy, z toho důvodu nebyly při mitóze správně orientovány a ve zvýšené míře docházelo k merotelickým připojením mikrotubulů (Stear a Roth, 2002). Jedním z názorů je, že za zvýšenou rigiditu chromozomů zodpovídá převážná aktivita kondenzinu II (Ono et al., 2003). Podle mého názoru je za to zodpovědná spíše kolokalizace kondenzinu II s CENH3, což vede k rozšíření působení kondenzinu II po celém chromozomu a tento jev způsobuje celkově vyšší rigiditu. V každém případě jsou potřebné další studie, které by porovnály rigiditu holokinetických a monocentrických chromozomů a potvrdily, že zvýšená rigidita je opravdu znakem specifickým pro holokinetickou stavbu chromozomů.

Na zamezení merotelických připojení se podílejí i kohezinové komplexy (Maddox et al., 2004) a konzervovaný mikrotubulární motor KLP-19 z rodiny chromokinesinů. KLP-19 působí na chromozomy ve směru od pólů, a to zřejmě spolu s kohezí sesterských chromatid po celé jejich délce vede k orientaci sesterských kinetochorů k opačným pólům (Powers et al., 2004).

6.3 Fosforylace histonu H3

Monocentrické a holokinetické chromozomy rostlin se liší lokalizací fosforylace histonu H3 v pozicích Serin 10 a Serin 28 na chromozomech. U rostlin s monocentrickými chromozomy je fosforylace histonu H3 v průběhu mitotického dělení omezena na definované úseky v pericentromerických oblastech (Houben et al., 2007). U rostlin s holokinetickými chromozomy byla během mitózy fosforylace pozorována po celé délce chromozomu (Gernand et al., 2003; Guerra et al., 2006; Marcon-Tavares et al., 2014).

Z odlišnosti lokalizace fosforylací Ser10 a Ser28 histonu H3 u monocentrických i holokinetických chromozomů v mitotickém dělení vyšších rostlin lze dedukovat, že se zřejmě jedná o modifikaci podílející se na kohezi sesterských chromatid (Gernand et al., 2003; Guerra et al., 2006).

U živočichů s monocentrickými a holokinetickými chromozomy nebyl rozdíl v rozložení fosforylovaných Ser10 a Ser28 histonu H3 zaznamenán. To je pravděpodobně důsledkem toho, že u živočichů se tyto modifikace v jaderném dělení podílejí na kondenzaci chromozomů, která se u monocentrických i holokinetických chromozomů vyskytuje po celé jejich délce (Sotero-Caio et al., 2011).

7 Závěr

Cílem mé práce bylo shrnout a diskutovat dosavadní poznatky o ultrastrukturní a molekulární stavbě holokinetických chromozomů. Vzhledem k tomu, že jsou genetické studie většinou zaměřeny na monocentrické chromozomy, je u holokinetických chromozomů celá řada neobjasněných procesů.

Při analýze ultrastrukturní stavby holokinetických chromozomů musíme čerpat převážně z publikací, které vznikaly v druhé polovině 20. stol. a aktuálnějších studií, které by využívaly nové metody, je nedostatek.

Studium molekulární stavby holokinetických chromozomů by mohlo pomoci objasnit mnohé aspekty studia chromozomů monocentrických. Jedná se např. o sestavení vnitřního kinetochoru. U holokinetických chromozomů se na rozdíl od monocentrických chromozomů tento proces odehrává na počátku každého jaderného dělení, což by mohlo usnadnit jeho studium.

Holokinetické chromozomy poskytují velký prostor pro další studie zabývající se například mechanismem asociace úseků s CENH3 a úseků s repetitivními sekvencemi na počátku jaderného dělení. Také není objasněn vztah mezi vysokou mírou syntenie a vysokou frekvencí chromozomových přestaveb holokinetických chromozomů.

8 Seznam použité literatury

(* sekundární zdroj)

Albertson, D.G., Thomson, J.N. (1982). The kinetochores of *Caenorhabditis elegans*. *Chromosoma* 86, 409–428.

Albertson, D.G., Thomson, J.N. (1993). Segregation of holocentric chromosomes at meiosis in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Chromosome Res.* 1, 15–26.

d'Alençon, E., Sezutsu, H., Legeai, F., Permal, E., Bernard-Samain, S., Gimenez, S., Gagneur, C., Cousserans, F., Shimomura, M., Brun-Barale, A., et al. (2010). Extensive synteny conservation of holocentric chromosomes in Lepidoptera despite high rates of local genome rearrangements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 7680–7685.

*Babu, A., Verma, R.S. (1987). Chromosome Structure: Euchromatin and Heterochromatin. In *International review of cytology*. (Academic Press), 1–60.

Barnes, T.M., Kohara, Y., Coulson, A., Hekimi, S. (1995). Meiotic recombination, noncoding DNA and genomic organization in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 141, 159–179.

*Biscotti, M.A., Olmo, E., Heslop-Harrison, J.S.P. (2015). Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Res.* 23, 415–420.

*Biterge, B., Schneider, R. (2014). Histone variants: key players of chromatin. *Cell Tissue Res.* 356, 457–466.

Blower, M.D., Sullivan, B.A., Karpen, G.H. (2002). Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans. *Dev. Cell* 2, 319–330.

Bongiorni, S., Fiorenzo, P., Pippoletti, D., Pranter, G. (2004). Inverted meiosis and meiotic drive in mealybugs. *Chromosoma* 112, 331–341.

Braserton, J.P. (1981). The ultrastructure of meiotic kinetochores of *Luzula*. *Chromosoma* 82, 143–151.

Buchwitz, B.J., Ahmad, K., Moore, L.L., Roth, M.B., Henikoff, S. (1999). Cell division: a histone-H3-like protein in *C. elegans*. *Nature* 401, 547–548.

Bühler, M., Gasser, S.M. (2009). Silent chromatin at the middle and ends: lessons from yeasts. *EMBO J.* 28, 2149–2161.

Bureš, P., Zedek, F. (2014). Holokinetic drive: centromere drive in chromosomes without centromeres. *Evolution* 68, 2412–2420.

*Bureš, P., Zedek, F., Marková, M. (2013). Holocentric Chromosomes. In *Plant Genome Diversity*, (Vienna: Springer), 178–208.

**C. elegans* Sequencing Consortium (1998). Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282, 2012–2018.

Cabral, G., Marques, A., Schubert, V., Pedrosa-Harand, A., Schlögelhofer, P. (2014). Chiasmatic and achiasmatic inverted meiosis of plants with holocentric chromosomes. *Nat. Commun.* 5, 5070.

*Cahoon, C.K., Hawley, R.S. (2016). Regulating the construction and demolition of the synaptonemal complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 23, 369–377.

de Carvalho, C.E., Zaaier, S., Smolikov, S., Gu, Y., Schumacher, J.M., Colaiácovo, M.P. (2008). LAB-1 antagonizes the Aurora B kinase in *C. elegans*. *Genes Dev.* 22, 2869–2885.

Chan, R.C., Severson, A.F., Meyer, B.J. (2004). Condensin restructures chromosomes in preparation for meiotic divisions. *J. Cell Biol.* 167, 613–625.

Claycomb, J.M., Batista, P.J., Pang, K.M., Gu, W., Vasale, J.J., van Wolfswinkel, J.C., Chaves, D.A., Shirayama, M., Mitani, S., Ketting, R.F., et al. (2009). The Argonaute CSR-1 and its 22G-RNA cofactors are required for holocentric chromosome segregation. *Cell* 139, 123–134.

Collet, C., Westerman, M. (1984). Interspersed distribution patterns of C-bands and satellite DNA in the holocentric chromosomes of *Luzula flaccida* (Juncaceae). *Genetica* 63, 175–179.

Collette, K.S., Petty, E.L., Golenberg, N., Bembek, J.N., Csankovszki, G. (2011). Different roles for Aurora B in condensin targeting during mitosis and meiosis. *J. Cell Sci.* 124, 3684–3694.

Comings, D.E., Okada, T.A. (1972). Holocentric chromosomes in *Oncopeltus*: kinetochore plates are present in mitosis but absent in meiosis. *Chromosoma* 37, 177–192.

Csankovszki, G., Collette, K., Spahl, K., Carey, J., Snyder, M., Petty, E., Patel, U., Tabuchi, T., Liu, H., McLeod, I., et al. (2009). Three distinct condensin complexes control *C. elegans* chromosome dynamics. *Curr. Biol.* 19, 9–19.

Dawe, R.K., Richardson, E.A., Zhang, X. (2005). The simple ultrastructure of the maize kinetochore fits a two-domain model. *Cytogenet. Genome Res.* 109, 128–133.

Demidov, D., Schubert, V., Kumke, K., Weiss, O., Karimi-Ashtiyani, R., Buttlar, J., Heckmann, S., Wanner, G., Dong, Q., Han, F., et al. (2014). Anti-phosphorylated histone H2A^{Thr120}: a universal microscopic marker for centromeric chromatin of mono- and holocentric plant species. *Cytogenet. Genome Res.* 143, 150–156.

Desai, A., Rybina, S., Müller-Reichert, T., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Hyman, A., Oegema, K. (2003). KNL-1 directs assembly of the microtubule-binding interface of the kinetochore in *C. elegans*. *Genes Dev.* 17, 2421–2435.

Drinneberg, I.A., deYoung, D., Henikoff, S., Malik, H.S. (2014). Recurrent loss of CenH3 is associated with independent transitions to holocentricity in insects. *ELife* 3, e03676.

Escudero M., Hipp A.L., Hansen T.F., Voje K.L., Luceño M. (2012). Selection and inertia in the evolution of holocentric chromosomes in sedges (*Carex*, Cyperaceae). *New Phytol.* **195**, 237–247.

Escudero, M., Maguilla, E., Loureiro, J., Castro, M., Castro, S., Luceño, M. (2015). Genome size stability despite high chromosome number variation in *Carex* gr. *laevigata*. *Am. J. Bot.* **102**, 233–238.

Ferrandiz, N., Barroso, C., Telecan, O., Shao, N., Kim, H.-M., Testori, S., Faull, P., Cutillas, P., Snijders, A.P., Colaiácovo, M.P., et al. (2018). Spatiotemporal regulation of Aurora B recruitment ensures release of cohesion during *C. elegans* oocyte meiosis. *Nat. Commun.* **9**, 834.

*Fuchs, J., Demidov, D., Houben, A., Schubert, I. (2006). Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity. *Trends Plant Sci.* **11**, 199–208.

*Garrido-Ramos, M.A. (2017). Satellite DNA: an evolving topic. *Genes* **8**, 230.

Gassmann, R., Rechtsteiner, A., Yuen, K.W., Muroyama, A., Egelhofer, T., Gaydos, L., Barron, F., Maddox, P., Essex, A., Monen, J., et al. (2012). An inverse relationship to germline transcription defines centromeric chromatin in *C. elegans*. *Nature* **484**, 534–537.

Gernand, D., Demidov, D., and Houben, A. (2003). The temporal and spatial pattern of histone H3 phosphorylation at serine 28 and serine 10 is similar in plants but differs between mono- and polycentric chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* **101**, 172–176.

Grbić, M., Leeuwen, T.V., Clark, R.M., Rombauts, S., Rouzé, P., Grbić, V., Osborne, E.J., Dermauw, W., Ngoc, P.C.T., Ortego, F., et al. (2011). The genome of *Tetranychus urticae* reveals herbivorous pest adaptations. *Nature* **479**, 487–492.

Guerra, M., García, M.A. (2004). Heterochromatin and rDNA sites distribution in the holocentric chromosomes of *Cuscuta approximata* Bab. (Convolvulaceae). *Genome* **47**, 134–140.

Guerra, M., Brasileiro-Vidal, A.C., Arana, P., Puertas, M.J. (2006). Mitotic microtubule development and histone H3 phosphorylation in the holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* (Cyperaceae). *Genetica* **126**, 33–41.

Hagstrom, K.A., Holmes, V.F., Cozzarelli, N.R., Meyer, B.J. (2002). *C. elegans* condensin promotes mitotic chromosome architecture, centromere organization, and sister chromatid segregation during mitosis and meiosis. *Genes Dev.* **16**, 729–742.

Haizel, T., Lim, Y.K., Leitch, A.R., Moore, G. (2005). Molecular analysis of holocentric centromeres of *Luzula* species. *Cytogenet. Genome Res.* **109**, 134–143.

Hauf, S., Biswas, A., Langeegger, M., Kawashima, S.A., Tsukahara, T., Watanabe, Y. (2007). Aurora controls sister kinetochore mono-orientation and homolog bi-orientation in meiosis-I. *EMBO J.* **26**, 4475–4486.

Heckmann S., Macas J., Kumke K., Fuchs J., Schubert V., Ma L., Novák P., Neumann P., Taudien S., Platzer M., et al. (2013). The holocentric species *Luzula elegans* shows interplay between centromere and large-scale genome organization. *Plant J.* **73**, 555–565.

Heckmann, S., Schroeder-Reiter, E., Kumke, K., Ma, L., Nagaki, K., Murata, M., Wanner, G., Houben, A. (2011). Holocentric chromosomes of *Luzula elegans* are characterized by a longitudinal centromere groove, chromosome bending, and a terminal nucleolus organizer region. *Cytogenet. Genome Res.* **134**, 220–228.

Heckmann, S., Jankowska, M., Schubert, V., Kumke, K., Ma, W., Houben, A. (2014). Alternative meiotic chromatid segregation in the holocentric plant *Luzula elegans*. *Nat. Commun.* 5, 4979.

*Henikoff, S., Ahmad, K., Malik, H.S. (2001). The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* 293, 1098–1102.

Herrán, Y., Gutiérrez-Caballero, C., Sánchez-Martín, M., Hernández, T., Viera, A., Barbero, J.L., de Álava, E., de Rooij, D.G., Suja, J.Á., Llano, E., et al. (2011). The cohesin subunit RAD21L functions in meiotic synapsis and exhibits sexual dimorphism in fertility. *EMBO J.* 30, 3091–3105.

Hipp, A.L., Rothrock, P.E., Roalson, E.H. (2009). The Evolution of chromosome arrangements in *Carex* (Cyperaceae). *Bot. Rev.* 75, 96–109.

Hirota, T., Gerlich, D., Koch, B., Ellenberg, J., Peters, J.-M. (2004). Distinct functions of condensin I and II in mitotic chromosome assembly. *J. Cell Sci.* 117, 6435–6445.

*Houben, A., Schubert, I. (2003). DNA and proteins of plant centromeres. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 554–560.

Houben, A., Demidov, D., Gernand, D., Meister, A., Leach, C.R., Schubert, I. (2003). Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *Plant J.* 33, 967–973.

*Houben, A., Demidov, D., Caperta, A.D., Karimi, R., Agueci, F., Vlasenko, L. (2007). Phosphorylation of histone H3 in plants-a dynamic affair. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 308–315.

Howe, M., McDonald, K.L., Albertson, D.G., Meyer, B.J. (2001). HIM-10 is required for kinetochore structure and function on *Caenorhabditis elegans* holocentric chromosomes. *J. Cell Biol.* 153, 1227–1238.

*Hudson, D.F., Marshall, K.M., Earnshaw, W.C. (2009). Condensin: architect of mitotic chromosomes. *Chromosome Res.* 17, 131–144.

Ituarte, S., Papeschi, A.G. (2004). Achiasmatic male meiosis in *Tenagobia* (*Fuscagobia*) *fuscata* (Stål) (Heteroptera, Corixoidea, Micronectidae). *Genetica* 122, 199–206.

Jensen, C., Bajer, A. (1969). Effects of dehydration on the microtubules of the mitotic spindle. *J. Ultrastruct. Res.* 26, 367–386.

Kurek, K.C., Matsumoto, L. (1995). Nonrandom arrangement of bovine satellite I DNA within the interphase nucleus of Madin-Darby bovine kidney cells. *Exp. Cell Res.* 216, 187–190.

Kuta, E., Bohanec, B., Dubas, E., Vizintin, L., Przywara, L. (2004). Chromosome and nuclear DNA study on *Luzula* - a genus with holokinetic chromosomes. *Genome* 47, 246–256.

Lipp, J.J., Hirota, T., Poser, I., Peters, J.-M. (2007). Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *J. Cell Sci.* 120, 1245–1255.

*Lysák, M.A., Schubert, I. (2013). Mechanisms of chromosome rearrangements. In *plant genome diversity*, (Springer, Vienna), 137–147.

*Ma, J., Wing, R.A., Bennetzen, J.L., Jackson, S.A. (2007). Plant centromere organization: a dynamic structure with conserved functions. *Trends Genet.* 23, 134–139.

Ma, W., Schubert, V., Martis, M.M., Hause, G., Liu, Z., Shen, Y., Conrad, U., Shi, W., Scholz, U., Taudien, S., et al. (2016). The distribution of α -kleisin during meiosis in the holocentromeric plant *Luzula elegans*. *Chromosome Res.* 24, 393–405.

*Maddox, P.S., Oegema, K., Desai, A., Cheeseman, I.M. (2004). “Holo”er than thou: chromosome segregation and kinetochore function in *C. elegans*. *Chromosome Res.* 12, 641–653.

Malik, H.S., Henikoff, S. (2001). Adaptive evolution of Cid, a centromere-specific histone in *Drosophila*. *Genetics* 157, 1293–1298.

Mandrioli, M., Zambonini, G., Manicardi, G.C. (2017). Comparative gene mapping as a tool to understand the evolution of pest crop insect chromosomes. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 1919.

Manicardi, G.C., Mandrioli, M., Bizzaro, D., Bianchi, U. (1998). Patterns of DNase I sensitivity in the holocentric chromosomes of the aphid *Megoura viciae*. *Genome* 41, 169–172.

Marcon-Tavares, A.B., Felinto, F., Feitoza, L., Barros e Silva, A.E., Guerra, M. (2014). Different patterns of chromosomal histone H3 phosphorylation in land plants. *Cytogenet. Genome Res.* 143, 136–143.

Marques, A., Ribeiro, T., Neumann, P., Macas, J., Novák, P., Schubert, V., Pellino, M., Fuchs, J., Ma, W., Kuhlmann, M., et al. (2015). Holocentromeres in *Rhynchospora* are associated with genome-wide centromere-specific repeat arrays interspersed among euchromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 13633–13638.

Martinez-Perez, E., Schvarzstein, M., Barroso, C., Lightfoot, J., Dernburg, A.F., Villeneuve, A.M. (2008). Crossovers trigger a remodeling of meiotic chromosome axis composition that is linked to two-step loss of sister chromatid cohesion. *Genes Dev.* 22, 2886–2901.

McEwen, B.F., Hsieh, C.E., Mattheyses, A.L., Rieder, C.L. (1998). A new look at kinetochore structure in vertebrate somatic cells using high-pressure freezing and freeze substitution. *Chromosoma* 107, 366–375.

*McKinley, K.L., Cheeseman, I.M. (2016). The molecular basis for centromere identity and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 16–29.

*McStay, B., Grummt, I. (2008). The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 131–157.

Mito, Y., Sugimoto, A., Yamamoto, M. (2003). Distinct developmental function of two *Caenorhabditis elegans* homologs of the cohesin subunit Scc1/Rad21. *Mol. Biol. Cell* 14, 2399–2409.

Monen, J., Maddox, P.S., Hyndman, F., Oegema, K., Desai, A. (2005). Differential role of CENP-A in the segregation of holocentric *C. elegans* chromosomes during meiosis and mitosis. *Nat. Cell Biol.* 7, 1248–1255.

*Musacchio, A., Desai, A. (2017). A molecular view of kinetochore assembly and function. *Biology* 6, 5–47.

Nabeshima, K., Villeneuve, A.M., Colaiácovo, M.P. (2005). Crossing over is coupled to late meiotic prophase bivalent differentiation through asymmetric disassembly of the SC. *J. Cell Biol.* 168, 683–689.

Nagaki, K., Kashihara, K., Murata, M. (2005). Visualization of diffuse centromeres with centromere-specific histone H3 in the holocentric plant *Luzula nivea*. *Plant Cell* 17, 1886–1893.

- *Nagpal, H., Fukagawa, T. (2016). Kinetochore assembly and function through the cell cycle. *Chromosoma* 125, 645–659.
- *Nasmyth, K., Haering, C.H. (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 74, 595–648.
- Nguyen, P., Sahara, K., Yoshido, A., Marec, F. (2010). Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* 138, 343–354.
- Oegema, K., Desai, A., Rybina, S., Kirkham, M., Hyman, A.A. (2001). Functional analysis of kinetochore assembly in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* 153, 1209–1226.
- *Onn, I., Heidinger-Pauli, J.M., Guacci, V., Ünal, E., Koshland, D.E. (2008). Sister chromatid cohesion: a simple concept with a complex reality. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 24, 105–129.
- Ono, T., Losada, A., Hirano, M., Myers, M.P., Neuwald, A.F., Hirano, T. (2003). Differential contributions of condensin I and condensin II to mitotic chromosome architecture in vertebrate cells. *Cell* 115, 109–121.
- Papeschi, A.G., Mola, L.M., Bressa, M.J., Greizerstein, E.J., Lía, V., Poggio, L. (2003). Behaviour of ring bivalents in holokinetic systems: Alternative sites of spindle attachment in *Pachylis argentinus* and *Nezara viridula* (Heteroptera). *Chromosome Res.* 11, 725–733.
- *Parker, J. (2001). Base composition. In encyclopedia of genetics, S. Brenner, and J.H. Miller, eds. (New York: Academic Press), 192.
- Pasierbek, P., Jantsch, M., Melcher, M., Schleiffer, A., Schweizer, D., Loidl, J. (2001). A *Caenorhabditis elegans* cohesion protein with functions in meiotic chromosome pairing and disjunction. *Genes Dev.* 15, 1349–1360.
- Pérez, R., Rufas, J.S., Suja, J.A., Page, J., Panzera, F. (2000). Meiosis in holocentric chromosomes: orientation and segregation of an autosome and sex chromosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Res.* 8, 17–25.
- Powers, J., Rose, D.J., Saunders, A., Dunkelbarger, S., Strome, S., Saxton, W.M. (2004). Loss of KLP-19 polar ejection force causes misorientation and missegregation of holocentric chromosomes. *J. Cell Biol.* 166, 991–1001.
- Ribeiro, T., Marques, A., Novák, P., Schubert, V., Vanzela, A.L.L., Macas, J., Houben, A., Pedrosa-Harand, A. (2017). Centromeric and non-centromeric satellite DNA organisation differs in holocentric *Rhynchospora* species. *Chromosoma* 126, 325–335.
- Rogers, E., Bishop, J.D., Waddle, J.A., Schumacher, J.M., Lin, R. (2002). The aurora kinase AIR-2 functions in the release of chromosome cohesion in *Caenorhabditis elegans* meiosis. *J. Cell Biol.* 157, 219–229.
- Schrader (1947). The role of the kinetochore in the chromosomal evolution of the heteroptera and homoptera. *Evolution* 1, 134–142.
- *Schwarzstein, M., Wignall, S.M., Villeneuve, A.M. (2010). Coordinating cohesion, co-orientation, and congression during meiosis: lessons from holocentric chromosomes. *Genes Dev.* 24, 219–228.
- Shelby, R.D., Vafa, O., Sullivan, K.F. (1997). Assembly of CENP-A into centromeric chromatin requires a cooperative array of nucleosomal DNA contact sites. *J. Cell Biol.* 136, 501–513.

da Silva, C.R.M., Quintas, C.C., Vanzela, A.L.L. (2010). Distribution of 45S and 5S rDNA sites in 23 species of *Eleocharis* (Cyperaceae). *Genetica* 138, 951–957.

Šmarda, P., Bureš, P., Horová, L., Leitch, I.J., Mucina, L., Pacini, E., Tichý, L., Grulich, V., Rotreklová, O. (2014). Ecological and evolutionary significance of genomic GC content diversity in monocots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, E4096–E4102.

Sotero-Caio, C.G., de Souza, M.J., Cabral-de-Mello, D.C., Brasileiro-Vidal, A.C., Guerra, M. (2011). Phosphorylation of histone H3S10 in animal chromosomes: is there a uniform pattern? *Cytogenet. Genome Res.* 135, 111–117.

Stear, J.H., Roth, M.B. (2002). Characterization of HCP-6, a *C. elegans* protein required to prevent chromosome twisting and merotelic attachment. *Genes Dev.* 16, 1498–1508.

Steiner, F.A., Henikoff, S. (2014). Holocentromeres are dispersed point centromeres localized at transcription factor hotspots. *ELife* 3, e02025.

*Strålfors, A., Ekwall, K. (2011). Heterochromatin and euchromatin—organization, boundaries, and gene regulation. In *Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine*, (American Cancer Society), 171–189.

Subirana, J.A., Messegue, X. (2013). A satellite explosion in the genome of holocentric nematodes. *PLoS One* 8, e62221.

Suja, J.A., del Cerro, A.L., Page, J., Rufas, J.S., Santos, J.L. (2000). Meiotic sister chromatid cohesion in holocentric sex chromosomes of three heteropteran species is maintained in absence of axial elements. *Chromosoma* 109, 35–43.

*Sumner, A.T. (2003). Euchromatin and the longitudinal differentiation of chromosomes. In *Chromosomes: organization and function*, (Blackwell Publishing), 117–132.

*Vagnarelli, P., Ribeiro, S.A., Earnshaw, W.C. (2008). Centromeres: old tales and new tools. *FEBS Lett.* 582, 1950–1959.

Vanzela, A.L.L., Guerra, M. (2000). Heterochromatin differentiation in holocentric chromosomes of *Rhynchospora* (Cyperaceae). *Genet. Mol. Biol.* 23, 453–456.

Vanzela, A.L.L., Cuadrado, A., Guerra, M. (2003). Localization of 45S rDNA and telomeric sites on holocentric chromosomes of *Rhynchospora tenuis* Link (Cyperaceae). *Genet. Mol. Biol.* 26, 199–201.

Veleba, A., Šmarda, P., Zedek, F., Horová, L., Šmerda, J., Bureš, P. (2017). Evolution of genome size and genomic GC content in carnivorous holokinetics (Droseraceae). *Ann. Bot.* 119, 409–416.

Wanner, G., Schroeder-Reiter, E., Ma, W., Houben, A., Schubert, V. (2015). The ultrastructure of mono- and holocentric plant centromeres: an immunological investigation by structured illumination microscopy and scanning electron microscopy. *Chromosoma* 124, 503–517.

*Watanabe, Y., Kitajima, T.S. (2005). Shugoshin protects cohesin complexes at centromeres. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 360, 515–521.

*Weber, C.M., Henikoff, S. (2014). Histone variants: dynamic punctuation in transcription. *Genes Dev.* 28, 672–682.

Wolf, K.W., Novák, K., Marec, F. (1992). Chromosome structure in spermatogenesis of *Anabolia furcata* (Trichoptera). *Genome* 35, 46–52.

Yano, O., Hoshino, T. (2006). Cytological Studies of Aneuploidy in *Eleocharis kamtschatica* (Cyperaceae). *Cytologia* (Tokyo) *71*, 141–147.

Yu, H.-G., Koshland, D. (2007). The Aurora kinase Ipl1 maintains the centromeric localization of PP2A to protect cohesin during meiosis. *J. Cell Biol.* *176*, 911–918.

Zedek, F., Bureš, P. (2016). Absence of positive selection on CenH3 in *Luzula* suggests that holokinetic chromosomes may suppress centromere drive. *Ann. Bot.* *118*, 1347–1352.

Zhang, T., Talbert, P.B., Zhang, W., Wu, Y., Yang, Z., Henikoff, J.G., Henikoff, S., Jiang, J. (2013). The CentO satellite confers translational and rotational phasing on cenH3 nucleosomes in rice centromeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E4875–4883.

Zhou, L., Liang, C., Chen, Q., Zhang, Z., Zhang, B., Yan, H., Qi, F., Zhang, M., Yi, Q., Guan, Y., et al. (2017). The N-terminal non-kinase-domain-mediated binding of haspin to Pds5B protects centromeric cohesion in mitosis. *Curr. Biol.* *27*, 992–1004.